



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**Terapia Génica Mitocondrial: Estudos *in vitro*
usando um sistema de transporte de DNA
plasmídico (pDNA) com afinidade pela
mitocôndria**

Ana Cristina Candeias Melo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Professora Doutora Diana Costa

Covilhã, outubro de 2018

Para os meus pais, irmão, sobrinha e avó, Amo-vos!

Agradecimentos

Em primeiro lugar queria agradecer à Professora Doutora Diana Costa por toda a disponibilidade e prontidão para ajudar a ultrapassar todo e qualquer obstáculo. Obrigada por todo o apoio e alento quando as coisas corriam menos bem e pelas palavras de ânimo quando corriam melhor. Aprendi que mesmo que as coisas pareçam difíceis ou quase impossíveis há sempre uma forma de dar a volta à situação e que com esforço e dedicação tudo se consegue. Obrigada por todo o profissionalismo e por, apesar de todos os altos e baixos e alguns contratemplos, sempre ter acreditado em mim para a realização deste trabalho.

Também não posso deixar de agradecer ao Rúben Faria que me ajudou na parte inicial deste trabalho, e sempre se mostrou disponível para ajudar e esclarecer qualquer dúvida que surgisse. Um obrigada também à Tânia Albuquerque pela companhia e ajuda nos últimos meses de trabalho no laboratório. Espero que a vida vos sorria sempre e que tenham muito sucesso.

Um agradecimento a todas as pessoas que trabalham diariamente no CICS-UBI por todo o acompanhamento laboratorial e à Universidade da Beira Interior por garantir as condições necessárias para o meu percurso académico e desenvolvimento deste trabalho.

Um enorme obrigada à Covilhã, cidade esta que foi a minha casa nos últimos 5 anos, que me acolheu sempre tão bem, que me fez realmente sentir em casa e na qual ganhei uma família de coração, obrigada à Joana Monteiro, à Inês Gonçalves, à Mafalda Presunto, à Leonor Ramos, ao Diogo Montenegro e ao Rúben Craveiro por terem partilhado comigo os melhores momentos da vida académica e dos últimos 5 anos. À Inês Rodrigues por tudo e por nada, por ser a minha companheira de todas as horas desde o primeiro ano, por partilhar comigo os melhores momentos e por estar presentes nos menos bons, e por nunca me ter deixado desistir... foi, sem dúvida, a melhor pessoa que esta cidade me trouxe! Levo-os a todos comigo para a vida!

Não posso também deixar de agradecer aos pais da Inês Rodrigues, senhor José Maria Rodrigues e senhora Celeste Rodrigues por todas as vezes que me acolheram na sua casa, por sempre me terem recebido tão bem, por todo o carinho e preocupação e por sempre me terem tratado como uma filha.

Por último, queria agradecer àqueles que tornaram isto tudo possível, aos meus pais, por lutarem com todas as forças pela minha felicidade e por acreditarem sempre que seria capaz de conquistar o mundo se assim o quisesse. Ao meu irmão pelo apoio incondicional. À minha sobrinha que, sem saber por ser tão pequenina, também me deu força para terminar esta etapa. E à minha avó materna, que, infelizmente, não terminou esta jornada comigo em “carne e osso”, mas que por ser uma guerreira e um exemplo de pessoa para mim me fez acreditar que tudo seria possível e, com toda a certeza, esteja ela onde estiver está também a olhar por mim. Amo-vos!!

Resumo

A mitocôndria é um organelo celular que possui o seu próprio genoma, o ADN mitocondrial (ADNmt). Apesar de bastante pequeno quando comparado com o ADN nuclear (ADNn), mutações ao nível do ADNmt são bastante frequentes devido à falta de mecanismos de proteção e de reparação, provocando disfunções no mecanismo de fosforilação oxidativa, o que afeta essencialmente órgãos e tecidos com grande demanda de energia, como é o caso dos músculos e do cérebro. Dado que os métodos convencionais de tratamento destas desordens mitocondriais se têm revelado ineficazes, torna-se crucial o desenvolvimento de protocolos terapêuticos inovadores e eficientes, dos quais se destaca a terapia génica mitocondrial (TGM).

Com este projeto tentamos desenvolver um novo sistema capaz de entregar de forma eficaz o ADN plasmídico (ADNp) à mitocôndria para uma possível utilização em TGM. Assim, o presente trabalho pode ser dividido em duas partes principais: uma primeira parte que inclui a síntese e caracterização de nanosistemas à base de ADNp e do polímero polietilenimina (PEI), e incorporação de compostos mitocondriotrópicos capazes de direcionar os sistemas para a mitocôndria; e uma segunda parte que integra estudos *in vitro* para testar a capacidade de transfeção celular das nanopartículas e a sua afinidade de direcionamento para a mitocôndria.

Os sistemas em estudo demonstraram ser biocompatíveis, com eficiências de encapsulação de ADNp elevadas, apresentam forma esférica ou oval com tamanhos inferiores a 300 nm e possuem potenciais zeta positivos, o que os torna adequados para uso em protocolos de TGM.

Os sistemas foram internalizados nas células e direcionados para a mitocôndria com sucesso. Estes resultados demonstram que a síntese de novos vetores com afinidade mitocondrial pode constituir um grande avanço na correção de defeitos mitocondriais, oferecendo uma nova estratégia terapêutica no combate a diversas patologias como o cancro e doenças neuromusculares e neurodegenerativas.

Palavras-chave:

Terapia génica mitocondrial, mitocôndria, nanopartículas, ADNmt, ADNp

Abstract

Mitochondrion is a cellular organelle that has its own genome, mitochondrial DNA. Although quite small compared to nuclear DNA, mutations in mitochondrial DNA are quite frequent due to the lack of protection and repair mechanisms, causing dysfunctions in the mechanism of oxidative phosphorylation, which essentially affects organs and tissues with large energy demand, as is the case of muscles and brain. Since conventional methods of treatment of these mitochondrial disorders have proved to be ineffective, the development of innovative and efficient therapeutic protocols, of which mitochondrial gene therapy (TGM) stands out, is crucial.

With this project we tried to develop a new system capable of efficiently deliver plasmid DNA to mitochondria for possible use in TGM. Thus, the present work can be divided into two main parts: a first part that includes the synthesis and characterization of nanosystems based on plasmid DNA and polyethyleneimine polymer, and incorporation of mitochondriotropic compounds capable of directing the systems to mitochondria; and a second part which integrates *in vitro* studies to test the cellular transfection capacity of the nanoparticles and their mitochondria targeting affinity.

The systems under study have been shown to be biocompatible, with high encapsulation efficiencies of plasmid DNA, presenting spherical or oval shape with sizes smaller than 300 nm and positive zeta potentials, which make them suitable to be used in TGM protocols.

The systems were cell internalized and targeted to the mitochondria with success. These results demonstrate that the synthesis of new vectors with mitochondrial affinity may constitute a major advance in the correction of mitochondrial defects, offering a new therapeutic strategy in the fight against several pathologies such as cancer and neuromuscular and neurodegenerative diseases.

Keywords:

Mitochondrial gene therapy, mitochondria, nanoparticles, mtDNA, pDNA

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Mitocôndria	2
1.1.1 Estrutura e função	2
1.1.2 ADN mitocondrial	4
1.1.2.1 Hereditariedade do genoma mitocondrial	6
1.1.2.2 Mutações e doenças mitocondriais	7
1.1.2.3 Envelhecimento	11
1.1.2.4 Diagnóstico e tratamento	11
1.1.2.5 Mecanismos de reparação	12
1.1.3 Papel das mitocôndrias em células vivas	14
1.1.3.1 Produção de energia	14
1.1.3.2 Produção e regulação de ERO	15
1.1.3.3 Regulação de cálcio	15
1.1.3.4 Regulação de apoptose	16
1.2 Terapia génica mitocondrial	17
1.2.1 Terapia génica viral	18
1.2.2 Terapia génica não viral	19
1.2.3 Nanotecnologia	20
1.2.3.1 Sistemas ADNp/PEI	21
1.3 Compostos mitocondriotrópicos	22
1.3.1 Trifenilfosfónio	22
1.3.2 Rodamina 123	24
Capítulo 2 - Objetivos	25
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	27
3.1 Materiais	27
3.2 Métodos	27
3.2.1 Síntese e caracterização de nanopartículas	27
3.2.1.1 Síntese de nanopartículas à base de ADNp/PEI	27
3.2.1.2 Morfologia das nanopartículas	28
3.2.1.3 Eficiência de encapsulação do ADNp	28
3.2.1.4 Eletroforese em gel de agarose	29
3.2.1.5 Eficiência de encapsulação da Rho123	29
3.2.1.6 Tamanho das nanopartículas e Potencial Zeta (ζ)	29
3.2.2 Crescimento e manutenção da cultura celular	30
3.2.3 Marcação do plasmídeo com FITC	31
3.2.4 Estudos de transfeção <i>in vitro</i>	31

3.2.5 Microscopia confocal de fluorescência	32
Capítulo 4 - Resultados	33
4.1 Morfologia das nanopartículas	33
4.2 Tamanho das nanopartículas	34
4.3 Potencial ζ	35
4.4 Eficiência de encapsulação	35
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	37
Capítulo 5 - Discussão	41
Capítulo 6 - Conclusões e Perspetivas futuras	45
Bibliografia	47

Lista de Figuras

Figura 1 - Morfologia da mitocôndria.	3
Figura 2 - Mapa do ADN mitocondrial humano, mostrando os genes que codificam as proteínas do complexo I, a NADH desidrogenase (ND1 a ND6), o citocromo b do complexo III (Cyt b), as subunidades do complexo IV (COI a COIII) e duas subunidades da ATP sintase (ATPase6 e ATPase8). Estão também representados os genes para ARN's ribossômicos (16S rRNA e 12S rRNA) e para vários ARN's de transferência específicos para a mitocôndria.	4
Figura 3 - Modelos de replicação do ADNmt de mamíferos. (A) deslocamento de cadeias; (B) acoplamento de cadeias; (C) incorporação de ARN ao longo da cadeia retardada. O _H e O _L representam a origem da síntese da cadeia pesada e da cadeia leve, respetivamente.	5
Figura 4 - Heteroplasmia do ADNmt. As mitocôndrias são aleatoriamente segregadas através do processo de divisão celular para os oócitos primários. Então, dependendo da quantidade de mitocôndrias mutantes adquiridas, os oócitos maduros podem ter diferentes níveis de mutação.	7
Figura 5 - Paradigma mitocondrial que explica as complexidades genéticas e fenotípicas da disfunção mitocondrial.	8
Figura 6 - Algoritmo de diagnóstico para suspeitas de doenças mitocondriais. O diagnóstico depende da história do paciente, dos sintomas clínicos e dos exames laboratoriais e genéticos. (-) negativo; (+) positivo; (LCR) líquido cefalorraquidiano; (FGF21) fator de crescimento de fibroblastos 21; (GDF15) fator 15 de crescimento/diferenciação.	12
Figura 7 - Mecanismo de reparação por excisão de bases.	13
Figura 8 - Mecanismo de produção de energia. Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores dispostos na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado por uma transferência de prótons através da membrana, produzindo um gradiente químico e elétrico. A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, pelo que estes só podem voltar a entrar na matriz apenas através de canais específicos (F ₀). A força motriz que conduz os prótons de volta à matriz fornece energia para a síntese de ATP, catalisada pela associação de F ₀ a F ₁	14
Figura 9 - Regulação dos níveis de cálcio mitocondrial.	15
Figura 10 - Via de apoptose intrínseca.	16
Figura 11 - Nanotecnologia específica para a mitocôndria.	20
Figura 12 - Estrutura química do PEI ramificado e do PEI linear.	21
Figura 13 - Estrutura geral de uma molécula incluindo o grupo de direcionamento para a mitocôndria, TPP.	23
Figura 14 - Estrutura química da rodamina 123.	24
Figura 15 - Imagens de Microscopia Eletrónica de Varrimento obtidas para nanopartículas baseadas em ADNp/PEI e em ADNp/PEI/composto mitocondriotrópico, com diferentes ampliações. A) ADNp/PEI com rácio N/P de 2; B) ADNp/PEI com rácio N/P de 5; C) ADNp/PEI	

com rácio N/P de 2/TPP 2 mg/mL; D) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/TPP 4 mg/mL; E) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/TPP 2 mg/mL; F) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/TPP 4 mg/mL; G) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/Rho123 2 mg/mL; H) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/Rho123 4 mg/mL; I) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/Rho123 2 mg/mL; J) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/Rho123 4 mg/mL. 33

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose que comprova a eficiência de encapsulação do plasmídeo. A) ADNp; B) ADNp/PEI rácio N/P de 2; C) ADNp/PEI rácio N/P de 5; D) ADNp/PEI rácio N/P de 2/ [2 mg/mL] de TPP; E) ADNp/PEI rácio N/P de 2/ [4 mg/mL] de TPP; F) ADNp/PEI rácio N/P de 5/ [2 mg/mL] de TPP; G) ADNp/PEI rácio N/P de 5/ [4 mg/mL] de TPP..... 36

Figura 17 - Capacidade de transfeção e estudos de co-localização para as nanopartículas de ADNp/PEI rácio 5/Rho123 [4mg/mL]. A) Núcleos marcados a azul pela sonda DAPI; B) ADNp marcado a verde pela sonda FITC; C) Nanopartículas marcadas a laranja devido à presença de Rho123 na sua composição; D) Mitocôndrias marcadas a vermelho pela sonda Mitotracker Orange CMTMROS; E) Sobreposição de todas as imagens. 37

Figura 18 - Capacidade de transfeção e de direcionamento para a mitocôndria dos diferentes sistemas. A) ADNp/PEI rácio N/P de 2; B) ADNp/PEI rácio N/P de 5; C) ADNp/PEI rácio N/P de 2/TPP [2 mg/mL]; D) ADNp/PEI rácio N/P de 2/TPP [4 mg/mL]; E) ADNp/PEI rácio N/P de 5/TPP [2 mg/mL]; F) ADNp/PEI rácio N/P de 5/TPP [4 mg/mL]; G) ADNp/PEI rácio N/P de 2/Rho123 [2 mg/mL]; H) ADNp/PEI rácio N/P de 2/Rho123 [4 mg/mL]; I) ADNp/PEI rácio N/P de 5/Rho123 [2 mg/mL]; J) ADNp/PEI rácio N/P de 5/Rho123 [4 mg/mL]. 38

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Patologias e respectivas manifestações clínicas associadas a mutações do genoma mitocondrial.	10
Tabela 2 - Comprimentos de onda de excitação e emissão das diferentes sondas usadas na microscopia confocal.	32
Tabela 3 - Tamanho médio do ADN plasmídico e dos diferentes nanosistemas. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).	34
Tabela 4 - Potencial zeta do ADNp e dos diferentes nanosistemas. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).	35
Tabela 5 - Eficiência de encapsulação do plasmídeo para os diferentes nanosistemas e da rodamina para os sistemas que incorporam o composto. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).	36

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADNp	ADN plasmídico
ADP	Adenosina difosfato
AP	Locais purínicos/apirimidínicos
Apaf-1	Fator de ativação de apoptose 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribossômico
ARNt	ARN de transferência
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	ATP sintase
Bcl-2	Célula B de linfoma 2
Ca ²⁺	Cálcio
CO ₂	Dióxido de Carbono
CLD	Catiões lipofílicos deslocalizados
Cyt b	Citocromo b
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DQAsomes	Vesículas semelhantes a lipossomas à base de DeQuAlinium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EAP1	Endonuclease AP1
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Eficiência de encapsulação
ERRO	Espécies reativas de oxigénio
FGF21	Fator de crescimento de fibroblastos 21
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GDF15	Fator 15 de crescimento/diferenciação
h	Horas
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil) - piperazin-1-il] - etanossulfónico
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogénio
Kbp	Quilo pares de bases
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilo Dalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotássico

kV	Quilo Volt
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MEB	Mecanismo de excisão de bases
MEBcd	Mecanismo de excisão de bases de curta duração
MEBl	Mecanismo de excisão de bases de longa duração
N	Azoto
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dissódico
ND	NADH desidrogenase
N/P	Rácio entre os grupos N do polímero e os grupos P do ADN
O	Oxigénio
O _H	Origem de replicação da cadeia pesada
O _L	Origem de replicação da cadeia leve
OH [*]	Radical hidroxilo
O ₂	Oxigénio molecular
O ₂ ^{**}	Anião superóxido
P	Fosfato
PBS	Tampão fosfato-salino
PEI	Polietilenimina
PEIL	Polietilenimina linear
PEIr	Polietilenimina ramificada
Pi	Fosfato inorgânico
PFA	Paraformaldeído
Poly	Polimerase gama
Rho123	Rodamina 123
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SEM	Microscópio eletrónico de varrimento
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TGM	Terapia génica mitocondrial
TPP	Trifenilfosfónio
UV	Ultravioleta

Capítulo 1- Introdução

O genoma humano é o conjunto de informação genética armazenada dentro dos 23 pares de cromossomas que se encontram no núcleo das células, mas também inclui uma pequena molécula circular de cadeia dupla situada na mitocôndria, o ADN mitocondrial (ADNmt).

O ADNmt, com aproximadamente 16 kbp, contém 37 genes [1] responsáveis por codificar 13 proteínas que participam na cadeia de fosforilação oxidativa, 2 ARN ribossomais (ARNr) e 22 ARN de transferência (ARNt) [2]. É através deste processo de fosforilação oxidativa que a mitocôndria converte a energia bioquímica presente nos alimentos, em adenosina trifosfato (ATP), por oxidação dos nutrientes que estes possuem [3]. Disfunções no ADNmt levam a um funcionamento desadequado do mecanismo de fosforilação oxidativa, o que faz com que as necessidades celulares de ATP não sejam saciadas [4].

Mutações no genoma mitocondrial estão associadas a várias síndromes metabólicas e degenerativas neuromusculares que envolvem tecidos que requerem altos níveis de energia, como o cérebro, o coração e os músculos [1]. Estudos sugerem que 1 em cada 8000 indivíduos são portadores de um distúrbio genético no ADNmt ou são afetados por uma mutação patogénica do mesmo [4].

A terapia génica tem vindo, cada vez mais, a emergir no que diz respeito ao tratamento de distúrbios relacionados com mutações no ADNmt. Esta terapia consiste na introdução de material genético nas células com o objetivo de tratar ou corrigir um gene deficiente responsável por uma doença [5]. Como tal, a terapia génica mitocondrial (TGM) parece ser uma potencial estratégia para o tratamento de disfunções mitocondriais. O uso de um vetor terapêutico à base de ADNmt em conjunto com compostos mitocôndriotrópicos, compostos com afinidade pela mitocôndria, como a rodamina ou o trifetilfosfónio (TEP), incorporados em nanosistemas, pode ser considerado uma potencial ferramenta no restabelecimento das funções normais deste organelo celular e por isso novas mudanças e estratégias devem ser testadas de modo a melhorar cada vez mais este método terapêutico. Nanotransportadores desenvolvidos recentemente são capazes de contornar o sistema imunitário inato, garantem proteção contra a degradação enzimática, possuem efeitos colaterais reduzidos, são seguros e apresentam uma boa biodistribuição, não são tóxicos para o organismo, a possibilidade de inflamação é reduzida e garantem que a carga terapêutica é libertada no compartimento celular desejado [6].

A incorporação de um vetor terapêutico é potencialmente vantajoso no que diz respeito ao restabelecimento do metabolismo energético da fosforilação oxidativa em células mutadas e representa uma abordagem inovadora no tratamento de disfunções mitocondriais.

Os vetores virais foram, em tempos, os sistemas de entrega de genes mais comuns usados na terapia génica devido à sua alta taxa de infeção e capacidade de integrar genes

terapêuticos no cromossoma hospedeiro de modo a assegurar uma expressão génica estável e a longo prazo. Contudo, a sua utilização na terapia génica diminuiu ao longo do tempo devido à falta de segurança associada a efeitos adversos fatais relatados em estudos anteriores [7]. Enquanto isso, o desenvolvimento de vetores não-virais para entrega de ácido desoxirribonucleico (ADN) tem vindo a atrair muita atenção nos últimos tempos devido às suas características de segurança aprimoradas, alta viabilidade celular, reduzida toxicidade e rapidez de fabrico [8-10].

A polietilenimina (PEI) é um polímero catiónico sintético utilizado em diversas aplicações, entre as quais, a terapia génica. O monómero básico de PEI possui um esqueleto de dois carbonos seguido por um átomo de azoto, e pode ser sintetizado nas formas lineares (PEIl) ou ramificadas (PEIr) [11]. Os sistemas de PEI/ADN são dos vetores não-virais mais eficazes [12]. Os grupos amina catiónicos do PEI ligam-se aos grupos fosfato aniónicos do ADN por atrações eletrostáticas de modo a neutralizar cargas e fazendo com que o ADN se condense em agregados estáveis e individuais facilitando a sua endocitose e protegendo-os contra a degradação enzimática antes da sua entrada no núcleo das células [12], [13].

Para que a TGM tenha sucesso é essencial que esta siga três regras importantes. Primeiro, a entrega de material genético deve ser feita ao organelo correto, neste caso, às mitocôndrias. Segundo, deve ser obtido um efeito benéfico sobre a função mitocondrial quando aplicada a células vivas. Terceiro, a modulação da função mitocondrial através da TGM deve ocorrer *in vivo* e ter um efeito terapêutico significativo [14].

1.1 Mitocôndria

As mitocôndrias são organelos encontrados em células eucarióticas que utilizam o oxigénio para transformar a energia proveniente dos metabolitos em energia de fácil acesso às células. Essa energia acumula-se em compostos transitórios e ricos em ligações energéticas, sendo o principal a adenosina trifosfato (ATP) [3], [15]. Estes organelos desempenham um papel fulcral não só no metabolismo energético celular, mas também na homeostase do cálcio, na produção e regulação de espécies reativas de oxigénio (ERO), na apoptose, no envelhecimento e no desenvolvimento celular [16]. Assim sendo, a disfunção deste organelo está associada a uma grande variedade de doenças degenerativas e metabólicas, cancro e envelhecimento, uma vez que todas estas manifestações clínicas resultam da bioenergética celular [17].

1.1.1 Estrutura e função

As mitocôndrias (figura 1) são pequenos organelos citoplasmáticos (0.5 a 1 μm) de forma tubular, estando presentes entre 10-100 cópias por célula somática [15], [18]. São

delimitadas por uma membrana externa e uma membrana interna que delineiam dois compartimentos distintos: um espaço aquoso intermembranar e o espaço da matriz mitocondrial mais interno. A membrana externa é permeável e permite a difusão passiva de moléculas de baixo peso molecular (até 10 kDa) através de uma família de proteínas formadoras de canais denominadas porinas. A membrana interna possui múltiplas dobras, conhecidas como cristas, que aumentam a sua área superficial efetiva. Esta membrana, quando comparada com a externa, é relativamente impermeável, exceto para canais de transporte ativo específicos, permitindo que um gradiente eletroquímico seja estabelecido através dela, e restringindo a entrada de moléculas polares que não possuem esses transportadores [15], [19].

Através da membrana interna, são incorporados os cinco complexos do mecanismo de fosforilação oxidativa, enquanto que no espaço matricial ocorre o ciclo do ácido cítrico, a β -oxidação e o ciclo da ureia [19].

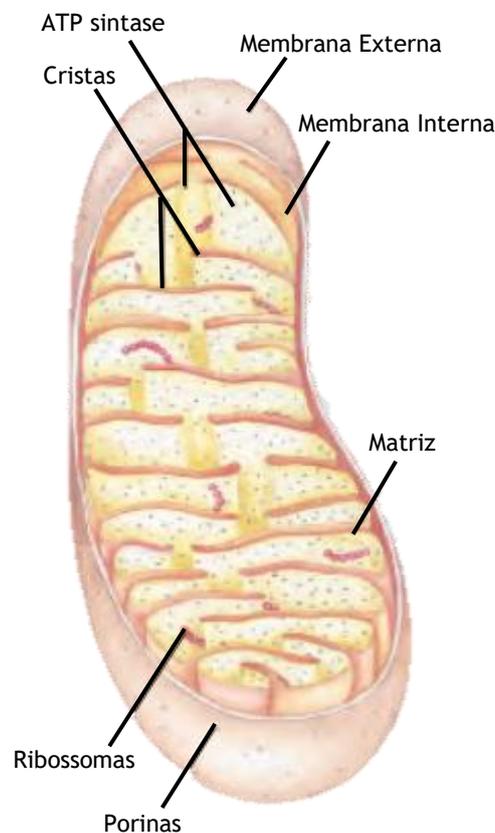


Figura 1 - Morfologia da mitocôndria. Adaptado de [20].

A mitocôndria desempenha um papel crucial no crescimento, desenvolvimento e manutenção de processos vitais, sendo considerada a força motriz da célula. Para além da sua função central que é a produção de energia na forma de ATP através do mecanismo de fosforilação oxidativa e por via da cadeia transportadora de elétrons, estes organelos também estão envolvidos em inúmeros outros processos celulares, como a homeostase de iões, movimentos dinâmicos de fusão e fissão necessários para uma correta atividade respiratória e

eficiência metabólica, produção e regulação de moléculas sinalizadoras e metabolitos tóxicos como ERO, morte celular necrótica e apoptótica, bem como no controlo do ciclo celular e crescimento celular [14], [21]-[24].

1.1.2 ADN mitocondrial

A informação genética humana pode ser encontrada na forma de ADN nuclear (ADNn), mas também numa segunda forma de genoma específico da mitocôndria, o ADNmt.

O ADNmt (figura 2) consiste numa molécula circular de cadeia dupla com, aproximadamente, 16 kpb que contém 37 genes dos quais 13 codificam proteínas envolvidas na cadeia transportadora de eletrões e fosforilação oxidativa. As subunidades proteicas dos complexos respiratórios I, III, IV e V são codificadas pelo ADNmt, enquanto que a subunidade proteica do complexo II é codificada pelo genoma nuclear [25]. Além disso, codifica também 2 ARNr (16S e 12S) e 22 ARNt que são necessários para a tradução das proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial [2]. Embora todas as proteínas codificadas pelo genoma mitocondrial sejam exclusivas deste organelo, a maioria das proteínas mitocondriais são codificadas no núcleo, sintetizadas no citoplasma e, por fim, direcionadas para a mitocôndria por sequências de direcionamento específicas [26].

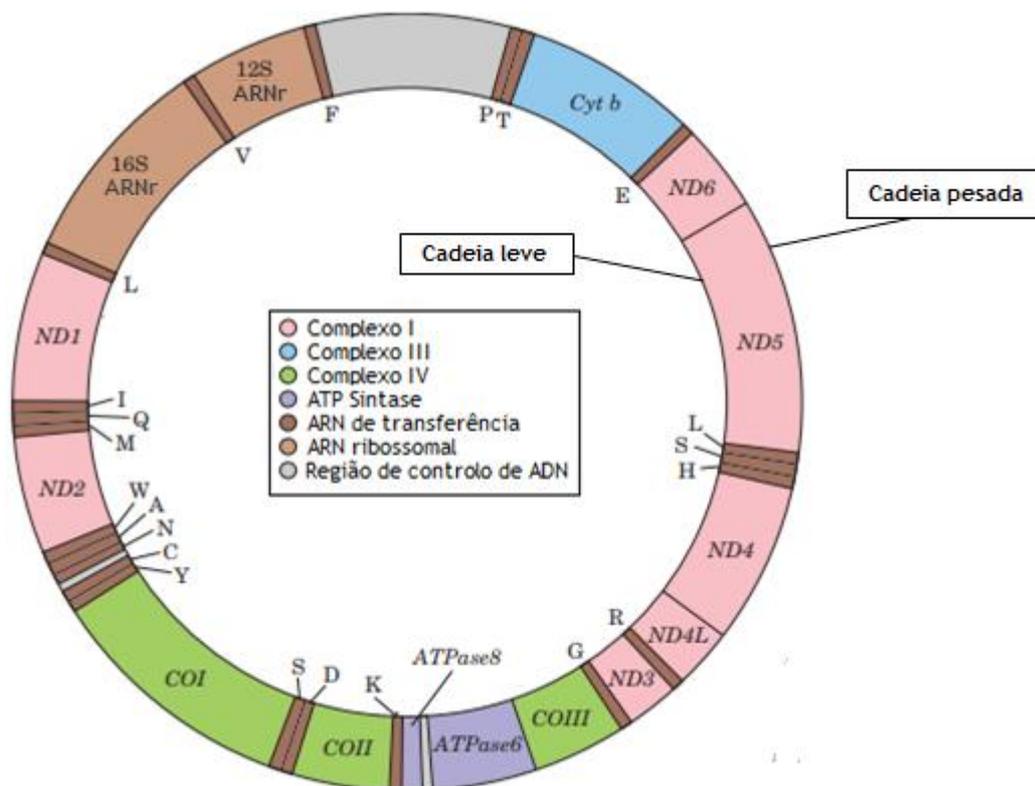


Figura 2 - Mapa do ADN mitocondrial humano, mostrando os genes que codificam as proteínas do complexo I, a NADH desidrogenase (ND1 a ND6), o citocromo b do complexo III (Cyt b), as subunidades do complexo IV (COI a COIII) e duas subunidades da ATP sintase (ATPase6 e ATPase8). Estão também representados os genes para ARN's ribossómicos (16S rRNA e 12S rRNA) e para vários ARN's de transferência específicos para a mitocôndria. Adaptado de [20].

A replicação do ADNmt é um processo contínuo e não é controlado pelo ciclo celular [27]. Atualmente, são sugeridos três modelos de replicação: deslocamento de cadeias, acoplamento de cadeias e incorporação de ácido ribonucleico (ARN) ao longo da cadeia retardada, representados na figura 3 [28], [29].

No primeiro modelo (figura 3A) a síntese da cadeia pesada inicia-se dentro da região “D-loop” não codificante, num local designado por O_H (origem de replicação da cadeia pesada). À medida que a síntese continua, os intermediários da replicação acumulam uma cadeia pesada progenitora deslocada, progressivamente maior, mantida na forma de cadeia simples. Quando atinge cerca de dois terços da distância ao redor do genoma, a origem da síntese da cadeia leve (O_L) retardada é exposta, permitindo o início da replicação da mesma e a continuação do processo de síntese. A replicação é unidirecional, contínua, assimétrica e assíncrona [29], [30].

O segundo modelo (figura 3B) parece apenas ocorrer quando as células se recuperam de mutações no ADNmt induzidas pelo brometo de etídio. Este sugere que para além da região “D-loop” há uma região de iniciação de replicação em que ambas as cadeias são sintetizadas em ambas as direções até, finalmente, parar na região “D-loop” [29], [31].

O terceiro e último modelo (figura 3C) baseia-se na incorporação de ARN em toda a cadeia retardada. A replicação inicia-se em O_H e a síntese de ADN progride com a incorporação paralela de ARN na cadeia retardada. Em algum momento, em O_L , inicia-se a síntese de ADN e o ARN da cadeia retardada é substituído ou convertido em ADN [29], [32].

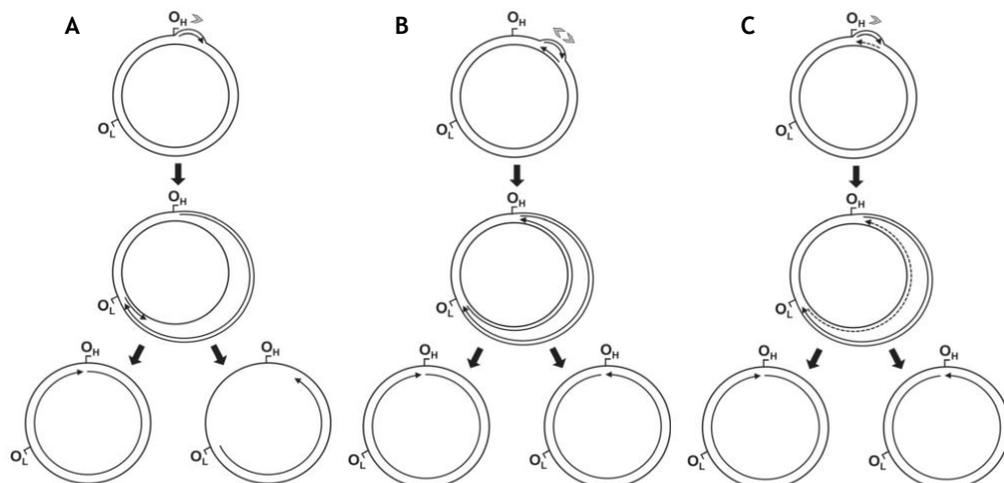


Figura 3 - Modelos de replicação do ADNmt de mamíferos. (A) deslocamento de cadeias; (B) acoplamento de cadeias; (C) incorporação de ARN ao longo da cadeia retardada. O_H e O_L representam a origem da síntese da cadeia pesada e da cadeia leve, respetivamente. Adaptado de [27].

1.1.2.1 Hereditariedade do genoma mitocondrial

Em mamíferos, normalmente, o ADNmt é herdado antes da fertilização [33] e após a replicação do mesmo [34]. Este método de herança sugere que as cópias de ADNmt feitas sejam idênticas (homoplasmia). No entanto, outros estudos revelam que não é assim tão raro que duas cópias diferentes de ADNmt, “wild-type” e mutante, estejam presentes na mitocôndria (heteroplasmia) [35], [36].

O ADNmt é herdado, na maioria dos animais, das mitocôndrias do oócito, o que torna a herança apenas materna [37]. Embora a herança materna do genoma mitocondrial seja conservada em muitas espécies, ainda não é bem compreendido porque é que as mitocôndrias e o ADNmt paternos devem ser eliminados dos zigotos. No entanto, existem três justificações possíveis para que não ocorra herança paterna do genoma mitocondrial: 1) as mitocôndrias e/ou o ADNmt podem ser fortemente danificados por ERO produzidas durante a espermatogénese ou pelo longo percurso dos espermatozoides; 2) a herança uniparental pode prevenir a heteroplasmia; 3) a herança uniparental pode prevenir de ADNmt potencialmente deletério [38].

Contudo, a herança uniparental não explica o porquê de uma mãe saudável dar origem a uma criança com elevada percentagem de ADNmt mutado. Uma possível explicação, e a mais bem aceite até hoje, sugere que uma mãe saudável pode dar à luz uma criança doente desde que ela possua algum ADNmt mutante [39]-[41].

A ideia (figura 4) é que no oócito primário seja selecionado aleatoriamente um pequeno número de mitocôndrias maternas. Quando o oócito se torna maduro há uma expansão do pouco ADNmt escolhido, e como o espermatozoide não contribui com mitocôndrias, se o ADNmt selecionado corresponder a uma elevada percentagem de ADNmt mutado significa que o descendente terá, efetivamente, uma doença grave mesmo que a mãe seja saudável [39], [42].

O grau de heteroplasmia pode variar de tecido para tecido e de indivíduo para indivíduo. Quando a percentagem de cópias mutantes ultrapassa um ponto crítico, poderá aparecer um novo fenótipo mutante que toma o lugar do fenótipo normal. Esse processo é conhecido como efeito de limiar [43]. Embora o valor necessário para atingir o limiar varie para diferentes tecidos e para o tipo de mutação, isso explica porque é que mães saudáveis podem ter filhos doentes.

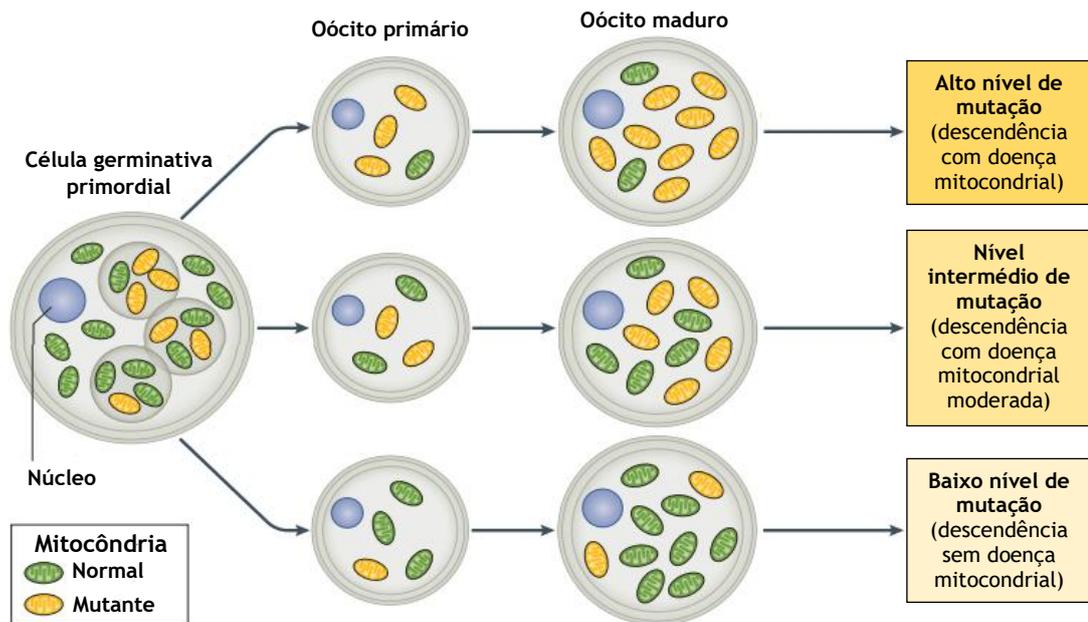


Figura 4 - Heteroplasmia do ADNmt. As mitocôndrias são aleatoriamente segregadas através do processo de divisão celular para os oócitos primários. Então, dependendo da quantidade de mitocôndrias mutantes adquiridas, os oócitos maduros podem ter diferentes níveis de mutação. Adaptado de [35].

1.1.2.2 Mutações e doenças mitocondriais

As mitocôndrias estão associadas a muitos distúrbios e doenças hereditárias, tais como doenças neurodegenerativas, cardiomiopatias, cancro, síndrome metabólica e obesidade. As doenças mitocondriais podem afetar qualquer sistema orgânico, manifestar-se em qualquer idade e podem ser herdadas de cromossomas somáticos, do cromossoma X, ou maternamente. Mutações patogénicas do ADNmt são uma causa significativa de doenças humanas, afetando milhões de indivíduos em todo o mundo e, atualmente, não há cura para distúrbios mitocondriais e os tratamentos existentes são apenas direcionados para o alívio dos sintomas [4], [44].

A principal função das mitocôndrias é a produção de ATP através da fosforilação oxidativa, e além disso também participam em vários outros processos. As doenças mitocondriais caracterizam-se, na sua maioria, por uma deficiência na produção de energia, em que um ou mais dos complexos intervenientes no processo de fosforilação oxidativa são disfuncionais, disfunção essa que em conjunto com outros fatores provoca um ciclo vicioso (figura 5) [45], [46].

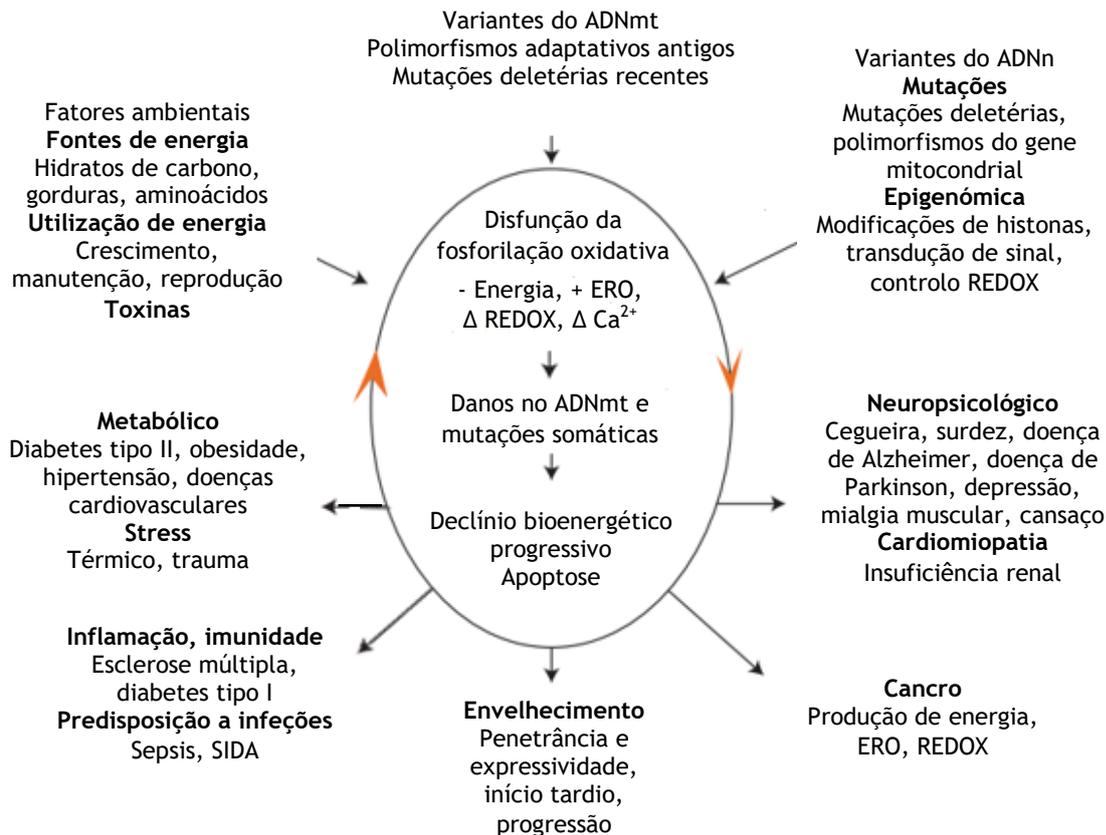


Figura 5 - Paradigma mitocondrial que explica as complexidades genéticas e fenotípicas da disfunção mitocondrial. Adaptado de [39].

O genoma mitocondrial é muito vulnerável a mutações devido à sua proximidade a locais de produção de ERO e porque não é protegido por histonas ou membranas [47]. Atualmente, são conhecidas cerca de 250 mutações patogénicas do ADNmt [48] e o fenótipo da doença depende da heteroplasmia do ADNmt e da sua percentagem de limiar nas células (60 - 90% de ADNmt mutado) [18], [49].

As apresentações clínicas das doenças mitocondriais são muito variáveis e os sintomas muitas vezes são vagos e inespecíficos num estado inicial. Envolvem, geralmente, órgãos com grande necessidade de energia, nomeadamente o cérebro e os músculos [50]. Alguns dos tecidos afetados por doenças mitocondriais são [51]-[54]:

1. Músculos: manifestam falta de energia e intolerância ao exercício devido ao baixo tónus muscular (hipotonia). Cólicas e dores musculares também são observadas.
2. Cérebro: problemas mentais como demência, transtornos mentais, atraso no desenvolvimento e distúrbios neuropsiquiátricos. Episódios de acidente vascular cerebral são muito comuns.
3. Coração: miopatia, bloqueios cardíacos e arritmias.
4. Rins: disfunção tubular renal proximal que resulta em perda de eletrólitos.
5. Olhos: neuropatia ótica e retinite pigmentosa que geralmente levam a alguma perda de visão e, em alguns casos, perda permanente.

6. Ouvidos: perda auditiva neuro-sensorial, que resulta em surdez.
7. Sistema endócrino: perda de peso, diabetes, hipoparatiroidismo e disfunção pancreática exócrina.

Têm sido observadas mutações em todo o genoma mitocondrial e algumas doenças específicas são frequentemente associadas a mutações em genes mitocondriais específicos e no ARNt mitocondrial, enquanto mutações no ARNr parecem ser menos frequentes (tabela 1).

Mutações somáticas, mutações que não estavam presentes nas células germinativas, mas ocorreram ao longo do tempo, podem ocorrer na mitocôndria. Mutações pontuais e deleções são as mais comuns. As mutações pontuais ocorrem essencialmente devido a três fatores: substituição de base causada por erros na polimerase γ (poly) [55]; proximidade com locais de formação de ERO e ausência de histonas.

Mutações nos genes do ADNmt são uma causa bastante frequente de citopatia mitocondrial, resultando numa enorme variedade de fenótipos clínicos associados a disfunções metabólicas severas, incluindo cardiomiopatia progressiva, encefalopatia, leucodistrofia, síndrome de Leigh ou síndrome das fibras vermelhas irregulares e sintomas prematuros relacionados com a idade [42], [56]-[65]. Além disso, mutações e/ou polimorfismo de variância nos genes mitocondriais estão relacionados com as doenças de Parkinson, Huntington e Alzheimer, diabetes e maior suscetibilidade de desenvolvimento de cancro [35], [66]-[73].

Tabela 1 - Patologias e respectivas manifestações clínicas associadas a mutações do genoma mitocondrial. Adaptado de [42], [74].

Patologia	Sintomas	Mutação mitocondrial
Síndrome de Leigh	Períodos agudos de regressão do neuro desenvolvimento seguidos de recuperação parcial, hipotonia, distonia, hipopneia, disfagia, epilepsia, déficit de crescimento, encefalopatia e lesões nos gânglios basais e no tronco encefálico.	ND3 ND5 ND6 ATPase6
Neuropatia ótica hereditária de Leber	Perda visual bilateral indolor subaguda. Pode também incluir distonia, síndromes de pré-excitação cardíaca e pode estar associada a sintomas semelhantes à esclerose múltipla (síndrome de Harding)	ND1 ND4 ND6
Fraqueza muscular neurogênica, ataxia e retinite pigmentosa	Danos nos nervos, falta de coordenação muscular e perda parcial ou total da visão. Também pode incluir convulsões, dificuldade de aprendizagem, demência, fraqueza muscular, anormalidades dos gânglios basais, perda auditiva, baixa estatura, defeitos de condução cardíaca, apneia obstrutiva do sono e distúrbios neuropsiquiátricos.	ATPase6
Miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidose láctica e episódios de acidente vascular cerebral	Pode incluir surdez, diabetes mellitus, retinopatia pigmentada, cardiomiopatia, ataxia cerebelar, convulsões, encefalopatia, acidose láctica e miopatia mitocondrial	ND1 ND5
Síndrome de Pearson	Anemia sideroblástica da infância associada à disfunção pancreática exócrina e / ou endócrina, pancitopenia e tubulopatia renal	Deleção
Epilepsia mioclônica com fibras vermelhas irregulares	Epilepsia mioclônica progressiva, ataxia, fraqueza. Também pode incluir retinopatia pigmentada, perda auditiva, acidose láctica, espasticidade e defeitos de condução cardíaca	ARNt (Leucina e Lisina)
Síndrome de Kearns-Sayre	Retinopatia pigmentar, níveis proteicos elevados no LCR, ataxia cerebelar, anormalidades na condução cardíaca, miopatia, diabetes mellitus, surdez, fraqueza bulbar e demência	Deleção

1.1.2.3 Envelhecimento

O processo de envelhecimento é caracterizado pela perda de funções fisiológicas e um aumento da probabilidade de desenvolver uma doença e morte. Acredita-se que estas mudanças que acontecem em todos os organismos estejam relacionadas com o declínio da atividade metabólica e, conseqüentemente, com as mitocôndrias.

Ao longo dos anos, o ADNmt sofre mutações, o que causa uma diminuição da função bioenergética mitocondrial, contribuindo para o envelhecimento. Em condições normais, as mitocôndrias produzem pouca quantidade de ERO que podem ser facilmente removidas através de agentes antioxidantes e enzimas. No entanto, estes organelos não possuem mecanismos de proteção e o dano oxidativo causa mutações no ADNmt. A acumulação de ADNmt mutante resulta na disfunção da cadeia respiratória, aumentando os níveis de produção de ERO e, conseqüentemente, aumentam também os danos oxidativos. Tudo isto leva ao declínio das funções celulares e teciduais, diminuindo também a quantidade de energia produzida e resultando em apoptose [75]-[77].

1.1.2.4 Diagnóstico e tratamento

No que diz respeito ao diagnóstico de doenças mitocôndrias, este é muito complexo. A heteroplasmia do ADNmt, a falta de um genótipo claro, interações fenotípicas e a complexa relação entre o genoma mitocondrial e nuclear são fatores que dificultam o diagnóstico de patologias mitocondriais. O diagnóstico laboratorial envolve a recolha de muitos tipos de informação, desde clínica, a histoquímica, bioquímica e genética, permitindo o desenvolvimento de algoritmos de diagnóstico racional (figura 6) [42], [78].

Em ensaios clínicos de larga escala, ainda nenhum fármaco mostrou total eficácia no tratamento deste tipo de doenças [79]. Nesse sentido, precisam ser desenvolvidas novas terapias e abordagens de tratamento para doentes com desordens mitocondriais. A terapia génica, da qual falarei mais adiante, oferece uma interessante alternativa às estratégias terapêuticas já aplicadas [4].

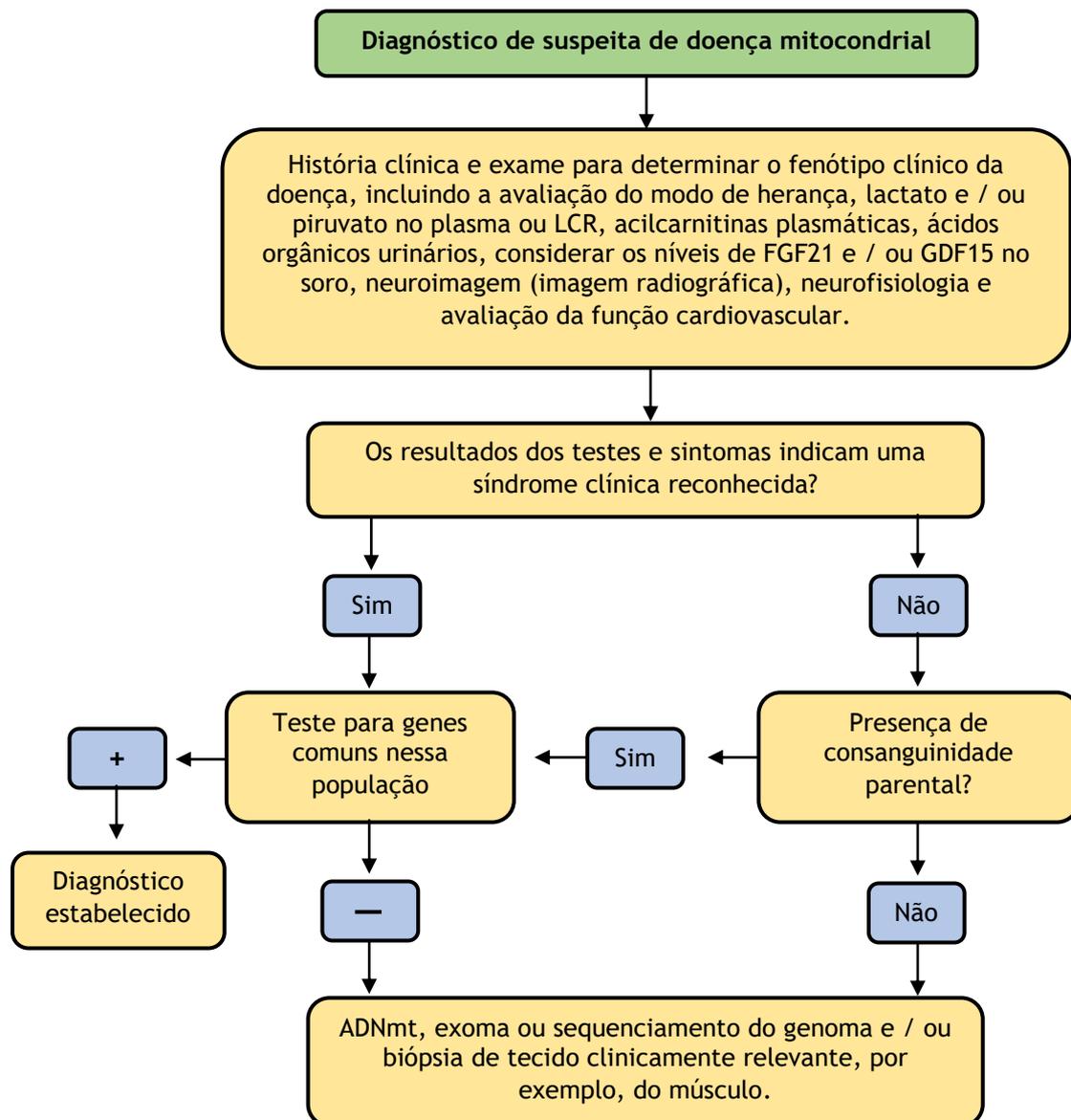


Figura 6 - Algoritmo de diagnóstico para suspeitas de doenças mitocondriais. O diagnóstico depende da história do paciente, dos sintomas clínicos e dos exames laboratoriais e genéticos. (-) negativo; (+) positivo; (LCR) líquido cefalorraquidiano; (FGF21) fator de crescimento de fibroblastos 21; (GDF15) fator 15 de crescimento/diferenciação. Adaptado de [36].

1.1.2.5 Mecanismos de reparação

Nas últimas décadas confirmou-se que as mitocôndrias possuem mecanismos eficazes no reparo de danos do ADNmt. A primeira via de reparo que foi descrita e que ocorre em mitocôndrias de mamíferos foi o mecanismo de excisão de bases (MEB). Este mecanismo, representado na figura 7, repara lesões causadas por alquilação, desaminação ou oxidação causados por ERO [80], [81].

Inicia-se com o reconhecimento do dano seguido por etapas de processamento enzimático que visam remover a lesão e restaurar a integridade genômica. O MEB facilita o reparo do ADN danificado através de duas vias gerais: o de curta duração (MEBcd) leva ao reparo de um único nucleotídeo, enquanto o de longa duração (MEBld) leva ao reparo de pelo menos dois nucleotídeos [77], [80], [81].

O primeiro passo deste mecanismo é catalisado por ADN glicosilases, que são responsáveis pelo reconhecimento inicial da lesão. O reparo dessas lesões promove a migração de vários processos enzimáticos para induzir quebras na cadeia simples de ADN e criação espontânea de locais purínicos/apirimidínicos (AP). Entre esses processos, a endonuclease AP1 (EAP1) é a mais importante e indispensável enzima para a clivagem desses locais e a continuação da reparação [77], [80], [81].

Uma vez que o sítio AP foi clivado por EAP1, o passo seguinte na via é catalisado por uma polimerase gama de ADN (poly γ), que insere o(s) nucleótido(s) correto(s) no intervalo gerado. Durante o MEBcd, um único nucleotídeo é incorporado no local lesado pela poly γ , enquanto o MEBld envolve a incorporação de vários nucleotídeos e enzimas adicionais [77], [80], [81].

O passo final do MEB mitocondrial é o fecho da clivagem, catalisado pela ADN ligase III [77], [80], [81].

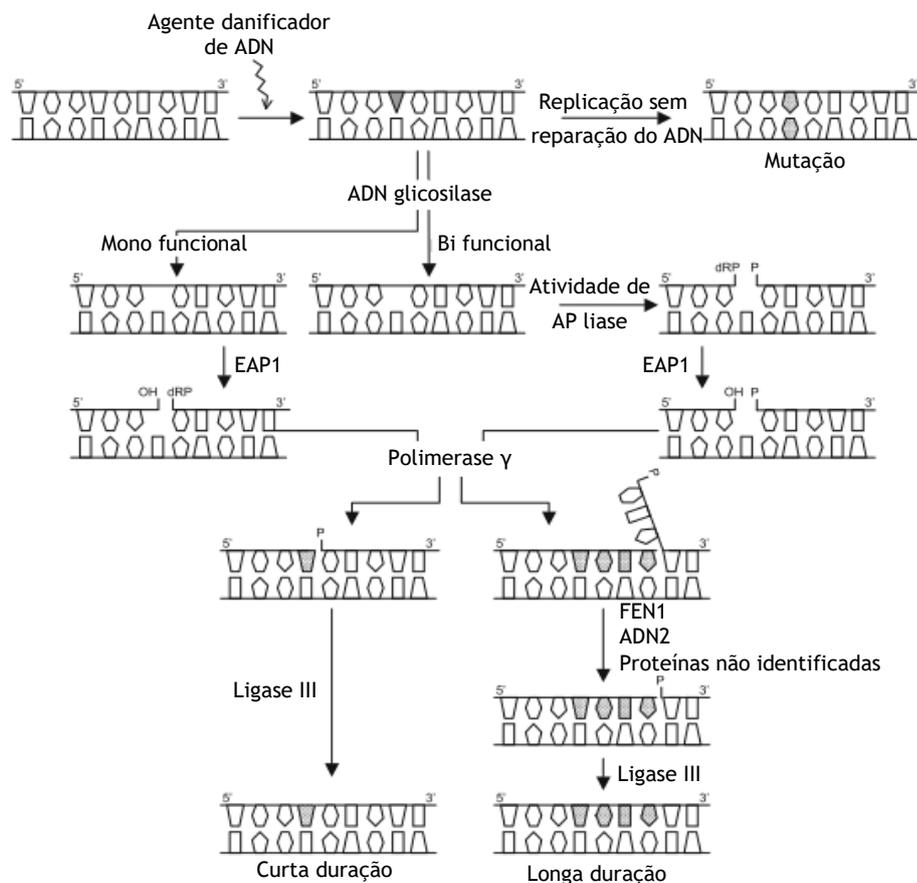


Figura 7 - Mecanismo de reparação por excisão de bases. Adaptado de [71].

1.1.3 Papel das mitocôndrias em células vivas

1.1.3.1 Produção de energia

O processo de fosforilação oxidativa permite que a mitocôndria converta a energia bioquímica armazenada nos alimentos em ATP, através da oxidação dos nutrientes [3]. Este processo resulta da cadeia respiratória mitocondrial que possui quatro complexos polipeptídicos de múltiplas subunidades localizados na membrana interna mitocondrial [20].

A fosforilação oxidativa (figura 8) inicia-se com a entrada de elétrons na cadeia respiratória através do complexo I (NADH desidrogenase ou ubiquinona oxirredutase) ou do complexo II (succinato desidrogenase ou succinato-coenzima Q redutase). Esses elétrons são posteriormente transferidos para o complexo III (citocromo b-c1 ou ubiquinona ou citocromo c oxirredutase), depois para o citocromo c e, finalmente, para o complexo IV (citocromo oxidase). Este último é a enzima terminal da cadeia respiratória, e tem a função de transportar os elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a água [17], [20], [82].

Todo este processo acaba por criar um potencial de membrana que promove a mudança conformacional do complexo V (ATP sintase), catalisando a conversão de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) em ATP [15].

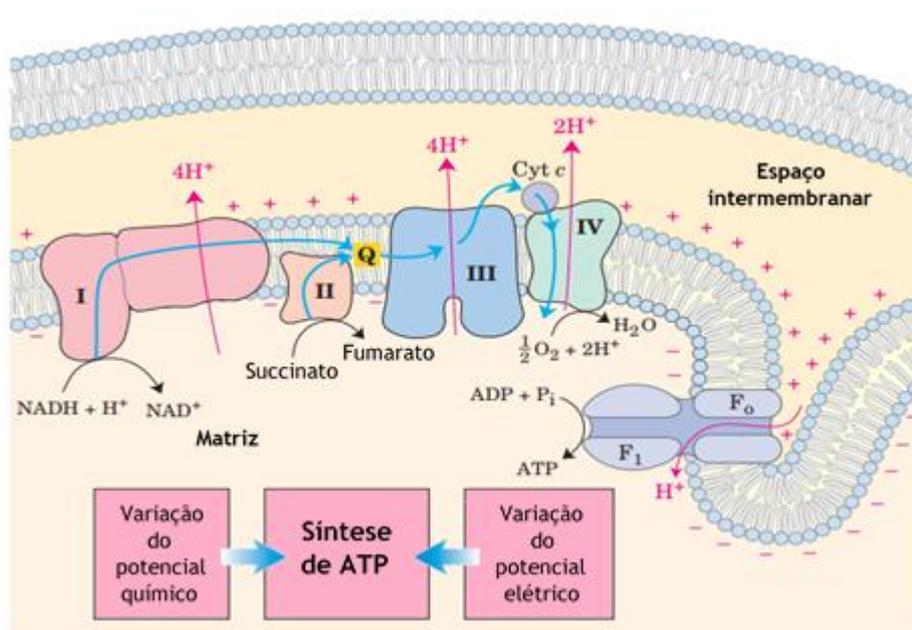


Figura 8 - Mecanismo de produção de energia. Os elétrons do NADH e de outros substratos oxidáveis passam através de uma cadeia de transportadores dispostos na membrana interna. O fluxo de elétrons é acompanhado por uma transferência de prótons através da membrana, produzindo um gradiente químico e elétrico. A membrana mitocondrial interna é impermeável aos prótons, pelo que estes só podem voltar a entrar na matriz apenas através de canais específicos (F₀). A força motriz que conduz os prótons de volta à matriz fornece energia para a síntese de ATP, catalisada pela associação de F₀ a F₁. Adaptado de [76].

1.1.3.2 Produção e regulação de ERO

As ERO, são derivados do oxigênio, que são oxidados e facilmente convertidos em radicais livres [83]. Têm sido descritas diversas perturbações induzidas pelas ERO mitocondriais que afetam funções celulares como a diferenciação, proliferação e apoptose, o que pode levar, tanto individual como coletivamente, a uma catástrofe energética celular.

Todos os complexos enzimáticos mitocondriais podem gerar ERO ou contribuir para o seu aparecimento [84]. As ERO são produzidas pelas mitocôndrias durante o metabolismo oxidativo através da redução de um eletrão de oxigênio molecular (O_2), dando origem ao anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Este anião é a ERO produzida pelas mitocôndrias e é, posteriormente, convertido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) através da ação da superóxido dismutase [85]. O H_2O_2 é então reduzido a água ou radical hidroxilo (OH^{\cdot}). A formação deste radical é catalisada por metais de transição reduzidos, que por sua vez podem voltar a ser reduzidos pelo anião superóxido, propagando este processo [85], [86].

Devido à natureza mutagénica de muitas das lesões induzidas por ERO, acredita-se que os radicais livres mitocondriais sejam uma importante fonte de mutações do ADNmt e instabilidade do ADN [44], [77], [86].

1.1.3.3 Regulação de Cálcio

O cálcio (Ca^{2+}) é um importante regulador da função mitocondrial e estimula a síntese de ATP. A desregulação da homeostase mitocondrial de Ca^{2+} desempenha um papel fundamental em várias patologias [87]-[89]. O Ca^{2+} presente na matriz é um regulador alostérico positivo de desidrogenases no ciclo do ácido cítrico e influencia a atividade dos complexos da cadeia transportadora de eletrões. Quando a concentração de Ca^{2+} mitocondrial aumenta (figura 9), a produção de ATP também aumenta, no entanto, um excesso de Ca^{2+} pode levar à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial na membrana mitocondrial interna. A abertura desse poro altera o potencial de membrana mitocondrial e os cofatores de caspases são libertados no citoplasma desencadeando uma cascata apoptótica [87], [90].

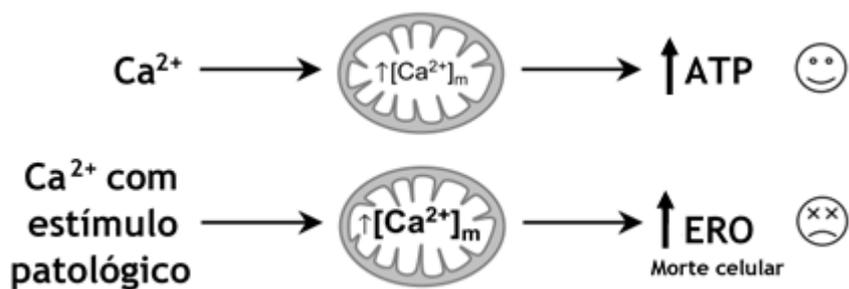


Figura 9 - Regulação dos níveis de cálcio mitocondrial. Adaptado de [83].

1.1.3.4 Regulação de apoptose

A apoptose é uma forma programada de morte celular essencial à homeostase dos tecidos. Tem duas vias principais, a apoptose intrínseca mediada pela mitocôndria, e a apoptose extrínseca mediada por recetores de morte na superfície celular [91]-[94].

A via intrínseca (figura 10) é a via mitocondrial da apoptose. É ativada em resposta a condições de stress, como danos no ADN ou stress oxidativo, resultando na permeabilização da membrana externa mitocondrial [95]. A família pró-apoptótica Bcl-2 regula essa permeabilização formando poros externos na membrana e levando à libertação de proteínas intermembranares mitocondriais como o citocromo c [96]. O citocromo c forma um complexo proteico composto por ele próprio, Apaf-1 e procaspase-9, ativando a caspase-9, que subsequentemente ativa a caspase-3, e leva à apoptose [97].

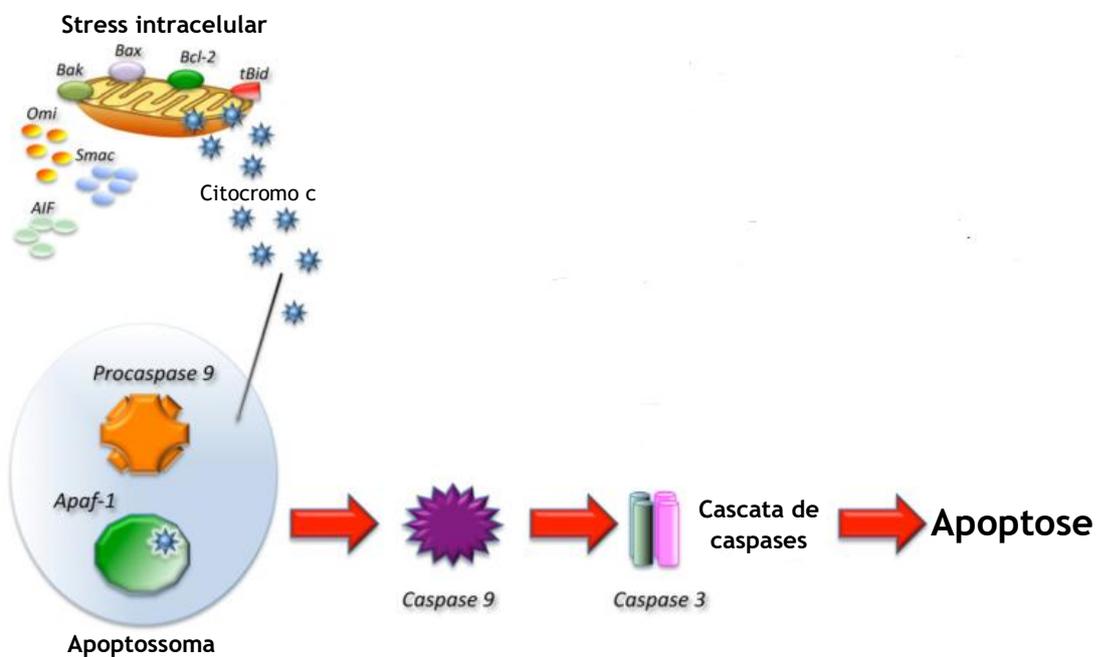


Figura 10 - Via de apoptose intrínseca. Adaptado de [90].

1.2 Terapia génica mitocondrial

As doenças mitocondriais têm muitos efeitos nocivos na vida dos pacientes, e as intervenções clássicas não têm tido sucesso na luta contra essas doenças. Posto isto, o interesse pela terapia génica tem vindo a crescer durante a última década, tornando-se uma tendência como abordagem terapêutica contra imensas doenças incuráveis.

Existem dois tipos principais de terapia génica: terapia génica de células somáticas e terapia génica de células germinativas. A terapia génica germinativa consiste na introdução de um gene nos gâmetas ou mais tarde no zigoto, o que resulta na transmissão de um gene benéfico para a descendência. Por muito bom que isto seja, os aspetos éticos tornaram impossível a sua aplicação em humanos. Portanto, a maior parte da pesquisa, hoje em dia, centra-se em células somáticas [98].

No seguimento do exposto, têm vindo a desenvolver-se vetores génicos com alta eficiência de transfeção e minimização da toxicidade.

Embora os vetores virais tenham revelado elevada eficácia, em contrapartida, a sua toxicidade e dificuldade de produção limitam a sua aplicação. Por outro lado, os vetores não virais têm uma baixa eficiência de transfeção, mas são preferidos devido à sua menor resposta imunitária e maior segurança [99].

A manipulação génica do ADNmt e dos seus produtos génicos são um assunto importante para a investigação no tratamento de disfunções do ADNmt. Um objetivo importante deve ser a correção dos defeitos da fosforilação oxidativa, pois é uma característica comum entre os distúrbios mitocondriais. A pesquisa em terapia génica para o tratamento de distúrbios do ADNmt é um campo emergente conhecido como terapia génica mitocondrial (TGM) [4].

Uma estratégia adequada de terapia génica mitocondrial (TGM) deve preencher um número mínimo de requisitos [14]:

- 1) O sistema transportador deve ser inicialmente absorvido pela célula hospedeira através de um mecanismo de internalização, como por exemplo, a endocitose. Uma vez dentro da célula, esse mesmo sistema deve direcionar-se para as mitocôndrias em vez de outros organelos intracelulares, como o núcleo, agindo como um agente mitocôndriotrópico.
- 2) O material genético deve ser capaz de atravessar a membrana mitocondrial externa e interna e alcançar a matriz onde poderá atingir o seu alvo. O alvo pode variar dentro de uma vasta lista que compreende todas as formas de ácidos nucleicos (ADNmt, ARNr, ARNt) dependendo do objetivo específico.
- 3) O sistema transportador deve trazer um efeito benéfico para as mitocôndrias. A introdução do material genético pode ser benéfica pela correção de uma mutação no ADNmt ou pela modulação da expressão génica. No entanto, se comprometer a integridade ou a sobrevivência da célula mesmo que estando associada a bons resultados, pode não ser um método de TGM viável.

- 4) O vetor de transfeção mitocondrial deve garantir uma expressão génica longa e sustentada.

1.2.1 Terapia génica viral

Os vetores virais já foram os mais comumente usados em terapia génica, devido à sua alta eficiência de transdução em células humanas e à sua capacidade de entrega de genes terapêuticos. No entanto, os vírus são entidades patogénicas, pelo que devem ser tomadas medidas para evitar que o vetor viral provoque qualquer tipo de doença. O método usual é remover genes que são essenciais para a replicação do vírus o que também aumenta a capacidade de alojar ADN exógeno. As funções que eram então fornecidas pelos genes que foram removidos e que estão, portanto, ausentes devem ser fornecidas por fontes alternativas, como por exemplo a utilização de um vírus auxiliar para produzir os produtos génicos em falta, mas na maioria dos casos é utilizada uma linha celular que é estavelmente transformada com os genes virais apropriados [98].

Os vetores virais vulgarmente usados em laboratório e clínica são baseados em vírus de ADN e ARN. Alguns vírus são particularmente selecionados como veículos de entrega de genes por causa da sua capacidade de transportar genes estranhos e de distribuir, eficientemente, esses genes associados à expressão génica eficiente. A entrega viral, ou transdução, envolve o empacotamento de ADN ou, em alguns casos, ARN numa partícula viral. Uma vez que o ADN ou ARN é empacotado, o vírus defeituoso pode ser isolado da linhagem celular tornando-o então apto a infetar a célula-alvo e introduzir a sua carga de material genético, mas não se pode replicar nem causar sintomas de doença. A transferência de genes ocorre pelo processo normal de infeção viral e é ao mesmo tempo eficiente e seletiva a nível celular [98].

Estas são as principais razões pelas quais vetores virais derivados de retrovírus, adenovírus, adenovírus associados, vírus herpes e *vaccinia* são utilizados em mais de 70% dos ensaios clínicos de terapia génica em todo o mundo. Como esses sistemas de vetor têm vantagens e limitações exclusivas, cada um deles é usado em situações diferentes, dependendo da sua adequação ao problema [98], [100], [101].

No entanto, várias desvantagens apresentadas pelos vetores virais como a antigenicidade, possibilidade de recombinação do vírus (157), potenciais efeitos oncogénicos (158, 159), dificuldade na produção em larga escala e instabilidade de armazenamento em conjunto com casos fatais associados a uma grave resposta inflamatória levou à procura de novos vetores.

1.2.2 Terapia génica não viral

A entrega de genes usando abordagens não-virais tem sido amplamente estudada como uma ferramenta básica para a transferência de genes intracelulares e terapia génica [102].

Os métodos não virais de entrega de genes têm sido explorados usando abordagens físicas (sem transportadores) e químicas (usando vetores sintéticos) [102].

As abordagens físicas incluem, microinjeção, injeção por agulha, eletroporação, ultrassons, injeção a jato, e distribuição hidrodinâmica e consistem em empregar uma força física que permeia a membrana celular e facilita a transferência de genes intracelulares [8], [102], [103].

Contudo, a transferência de genes com ADN “nu” atrai muitos investigadores devido à sua simplicidade e baixo nível de toxicidade. No entanto a transferência génica mediada por ADN “nu” usada como método de terapia génica pode não ser plausível porque o ADN sendo altamente hidrofílico e de grande tamanho, é facilmente mantido fora das células por várias barreiras físicas. Além disso, a degradação do ADN por ação das nucleases intra e extracelulares reduz ainda mais a possibilidade do ADN entrar no organelo de interesse intacto e funcional. A estratégia atual para melhorar a transferência génica de ADN “nu” é incluir na solução de ADN substâncias capazes de aumentar a eficiência de internalização do ADN pelas células alvo, como por exemplo: solventes imiscíveis em água, polímeros não iónicos, surfactantes, ou soluções hipotónicas [102].

As abordagens químicas utilizam compostos sintéticos ou de origem natural como veículos para a entrega de genes às células [102], [103]. A estratégia mais estudada para a entrega de genes não-virais é a formulação de partículas condensadas contendo ADN, usando lípidos catiónicos ou polímeros catiónicos. As partículas são absorvidas pelas células por endocitose, macropinocitose ou fagocitose na forma de vesículas intracelulares, das quais uma pequena fração do ADN é libertada no citoplasma e, posteriormente, migra para o organelo de interesse, onde ocorre a expressão do gene [102].

A terapia génica não viral tem a capacidade de ultrapassar algumas das limitações relacionadas com a terapia génica viral, como a carcinogénese, imunogenicidade, amplo tropismo, limitada capacidade de empacotamento de ADN e dificuldade de produção vetorial [103], [104]. Os vetores sintéticos tendem a ter menor imunogenicidade que os vetores virais, têm o potencial de fornecer maiores cargas genéticas e são tipicamente mais fáceis de sintetizar do que os vetores virais. No entanto, os vetores sintéticos possuem uma baixa eficiência de entrega em relação aos vetores virais, porque, ao contrário dos vírus que são capazes de entregar eficientemente o seu genoma às células de mamíferos, a maioria dos vetores sintéticos são incapazes de transportar efetivamente a sua carga através das múltiplas barreiras que enfrentam [103].

1.2.3 Nanotecnologia

A nanotecnologia utiliza princípios e técnicas à escala nano para criar novos dispositivos e sistemas à base de princípios e materiais biológicos de modo a compreender e mudar os biosistemas e criar novos dispositivos e sistemas [105].

Os nanosistemas possuem propriedades físicas e biológicas únicas que podem ser usadas para ultrapassar problemas de entrega de genes. Eles podem garantir proteção contra a degradação enzimática, são capazes de contornar o sistema imunitário inato, apresentam boa biodistribuição, reduzem os efeitos colaterais, são seguros, não tóxicos, reduzem a resposta inflamatória e a carga terapêutica pode ser libertada no alvo de interesse [6].

Nos últimos anos, o aumento das abordagens terapêuticas direcionadas para desordens mitocondriais, como a TGM, resultou na necessidade de desenvolver novos sistemas de entrega de ácidos nucleicos à mitocôndria. Lipossomas, “DQAsomes”, micelas poliméricas e nanopartículas associados a compostos mitocondriotrópicos (figura 11) como a rodamina e o TPP são exemplos de novos sistemas de entrega não virais que respondem a essa mesma necessidade [25].

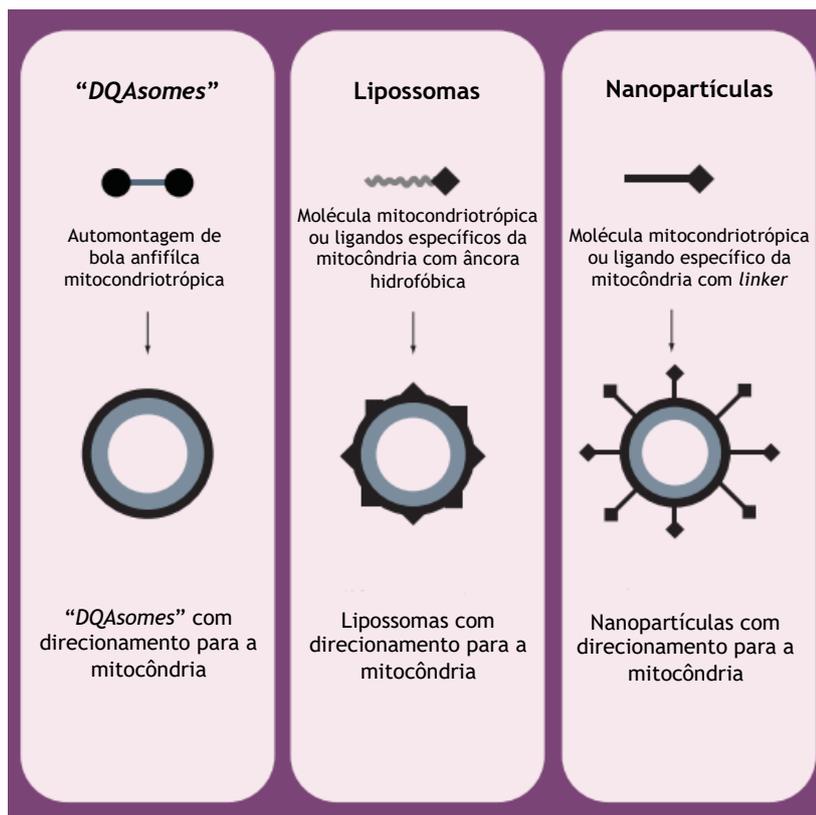


Figura 11 - Nanotecnologia específica para a mitocôndria. Adaptado de [106].

1.2.3.1 Sistemas ADNp/PEI

A polietilenimina (PEI) é um polímero sintético amplamente utilizado em diversas aplicações. Em 1995, o PEI foi usado como vetor genético, alcançando altos níveis de transfeção genética *in vivo* com valores comparáveis àqueles obtidos com vetores virais [107]. Desde então, o PEI tem sido amplamente estudado e é considerado o mais eficiente polímero usado em terapia gênica. O monômero básico de PEI possui um esqueleto de dois carbonos seguido por um átomo de azoto, e pode ser sintetizado nas formas lineares (PEI_l) ou ramificadas (PEI_r) [11], como mostrado na figura 12.

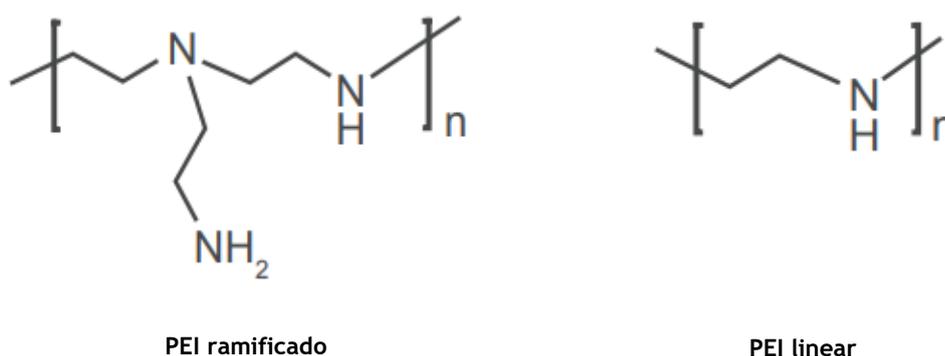


Figura 12 - Estrutura química do PEI ramificado e do PEI linear. Adaptado de [135].

O PEI é um polímero não degradável no qual o peso molecular se correlaciona com a citotoxicidade inerente e com a atividade de transfeção. Longas cadeias de PEI levam a maiores eficiências de transfeção, mas, em contrapartida, mostram valores mais altos de citotoxicidade devido à perturbação pronunciada da membrana celular pela alta densidade de carga das cadeias [108]-[110]. Estudos mostram que o tamanho mais adequado deve ser igual ou inferior a 25 kDa devido a preocupações de segurança relacionadas com a toxicidade do polímero. No entanto, PEI com uma menor densidade de carga, bem como um menor peso molecular, pode comprometer a eficiência da transfeção [111].

No que diz respeito à formação dos poliplexos ADNp/PEI, os grupos amina catiónicos (N) do PEI ligam-se aos grupos ácidos aniônicos (P) do ADN por atração eletrostática de forma a neutralizar as cargas de superfície e de maneira a que o ADN seja condensado em agregados individuais estáveis, facilitando a sua endocitose e fornecendo uma proteção contra a degradação enzimática antes de entrar na célula [12].

As propriedades do PEI como o peso molecular, a arquitetura da cadeia ou o grau de ramificação possuem um papel relevante na determinação do comportamento dos poliplexos, assim como na sua eficiência de transfeção e citotoxicidade [112]-[116]. Estudos recentes comprovam que o PEI de elevado peso molecular é mais citotóxico, mas também mostra melhor eficiência de transfeção quando comparado com o PEI de baixo peso molecular. Contudo, os sistemas de PEI de baixo peso molecular podem ser modificados de modo a

alcançar uma eficiência de transfeção semelhante ou maior do que os de maior peso molecular [114], [117], [118]. Mais importante que o peso molecular, parece ser a arquitetura da cadeia. O PEI compacta o ADN de forma mais eficiente do que o PEI, o que se deve à sua maior densidade de grupos amina primários. Devido à sua elevada densidade de carga, o PEI permite uma maior ligação às células e absorção celular, no entanto é mais citotóxico [115], [119]-[121].

Além disso, a eficácia destes vetores à base de ADNp e PEI para a entrega de genes está dependente do rácio entre os grupos azoto do polímero e os grupos fosfato ao ADN (rácio N/P), que tem influência direta no tamanho e nas cargas de superfície dos sistemas [112], [115], [122]-[126].

Quando se fala do sistema “ideal” a escolha é difícil, porque ambos os políplexos de PEI apresentam vantagens e desvantagens. Os sistemas de PEI possuem tamanhos maiores e baixas eficiências de encapsulação de genes ou fármacos; enquanto que os sistemas de PEI apresentam melhorias desses parâmetros, mas a citotoxicidade é elevada, especialmente para rácios N/P mais elevados [127].

1.3 Compostos mitocondriotrópicos

O direcionamento da terapia para organelos intracelulares específicos pode maximizar o efeito do medicamento e minimizar os efeitos colaterais [128].

Durante a última década, a utilização de compostos com afinidade para a mitocôndria tem ganho muito interesse. Devido ao potencial negativo da membrana interna mitocondrial, compostos com carga positiva acumulam-se na matriz mitocondrial contra o seu gradiente de concentração. Vários catiões lipofílicos, como catiões de alquiltrifenilfosfónio, rodamina e péptidos catiónicos, podem ligar-se ao composto bioativo de interesse de modo a melhorar a sua absorção mitocondrial [129].

1.3.1 Trifenilfosfónio

A classe principal de moléculas com direcionamento mitocondrial são os catiões lipofílicos deslocalizados (CLD). O catião trifenilfosfónio (TPP) é o mais comum dentro desta classe e acumula-se em concentrações 5 a 10 vezes maiores no citoplasma quando comparado com o ambiente extracelular, e em concentrações centenas de vezes maiores na mitocôndria, nomeadamente na membrana mitocondrial interna, quando comparado com o citoplasma [130].

As propriedades exclusivas do TPP têm sido investigadas com o objetivo de ajudar a direcionar uma série de agentes terapêuticos para a mitocôndria, incluindo antioxidantes,

agentes anticancerígenos, péptidos, ácidos nucleicos, e fotossensibilizadores no caso da terapia fotodinâmica, através da conjugação direta com o fármaco ou através de um nanotransportador. A capacidade de combinar as propriedades de direcionamento de CLD com nanotransportadores pode resultar no desenvolvimento de novas tecnologias de distribuição de fármacos com potencial para tratar distúrbios mitocondriais, pois cargas mais elevadas, libertação controlada de fármacos no tempo e no espaço e farmacocinética melhorada podem ser potencialmente alcançadas controlando a química do nanotransportador [130].

A eficiência de co-localização do TPP com a mitocôndria está relacionada com a sua natureza lipofílica e carga positiva deslocalizada, que permite ao TPP atravessar as membranas (hidrofóbicas) que possuem grandes potenciais negativos como é o caso da mitocôndria [128], [130] .

A figura 13 mostra a estrutura de uma molécula típica com um grupo funcional ligado ao catião TPP.

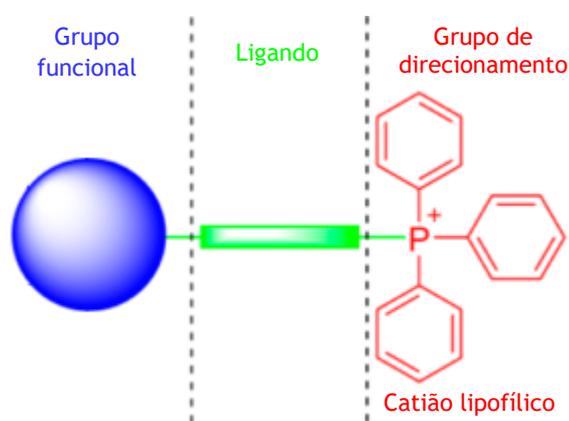


Figura 13 - Estrutura geral de uma molécula incluindo o grupo de direcionamento para a mitocôndria, TPP. Adaptado de [108].

A molécula possui uma porção não direcionada (representada a azul) ligada ao catião lipofílico TPP (representado a vermelho) através de uma cadeia alquila ou outro ligando (representado a verde). Dependendo do comprimento da cadeia ligante (normalmente 2 a 10 carbonos), a lipofilicidade, a captação celular e o local de sequestro mitocondrial podem variar [129].

O direcionamento mitocondrial baseado no TPP possui diversas vantagens quando comparado com outras abordagens de entrega de pequenas moléculas à mitocôndria, sendo elas: a estabilidade do TPP em sistemas biológicos, uma combinação de propriedades lipofílicas e hidrofílicas, a síntese e purificação relativamente simples e a baixa reatividade química em relação aos componentes celulares [129].

1.3.2 Rodamina 123

A rodamina 123 (Rho123) é um CLD que se acumula seletivamente nas mitocôndrias de células vivas, sem efeito citotóxico e que, devido à sua fluorescência verde, tem sido usada como corante mitocondrial [131]. Na figura 14 está representada a sua estrutura química.

A Rho123 demonstrou possuir atividade anticancerígena seletiva, tanto *in vitro* como *in vivo*, quer quando utilizada isoladamente ou em combinação com outros agentes anticancerígenos. As mitocôndrias de uma variedade de carcinomas retêm a Rho123 por períodos prolongados (2 a 5 dias), enquanto as células epiteliais normais a libertam em poucas horas. A captação e retenção aumentada da Rho123 em células cancerígenas deve-se ao elevado potencial da membrana mitocondrial e plasmática [129]. As diferenças do potencial de membrana mitocondrial entre as células normais e cancerígenas contribuem para a citotoxicidade seletiva apresentada por este composto. A toxicidade seletiva apresentada pela Rho123 observa-se em várias células de carcinoma *in vitro* e em células da medula óssea, além disso acumula-se também, seletivamente, *in vivo* no tecido tumoral de glioma quando comparado com tecido cerebral normal.

Em comparação com catiões lipofílicos semelhantes à rodamina, os catiões baseados em TPP têm demonstrado maior eficiência na inibição da proliferação de células cancerígenas, e numerosos compostos ligados ao TPP estão, atualmente, a ser desenvolvidos para visar células cancerígenas de forma seletiva [129].

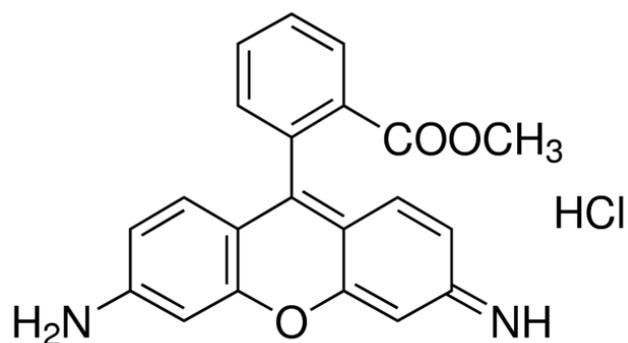


Figura 14 - Estrutura química da rodamina 123.

Capítulo 2 - Objetivos

O genoma mitocondrial está sujeito a diversas mutações devido à falta de mecanismos de proteção e reparo. Mutações em genes mitocondriais são uma causa bastante frequente de alterações celulares ou anomalias dos seus constituintes, e na maioria dos casos, os tratamentos convencionais que usam uma combinação de diferentes fármacos, são ineficientes.

A terapia génica mitocondrial surge como uma nova e promissora perspetiva para tratar desordens do ADNmt. É uma abordagem prática e potencialmente eficaz para tratar os diversos fenótipos clínicos, uma vez que atua no local exato da mutação.

Para que a terapia génica mitocondrial seja viável em ambiente clínico, é imperativo a formulação de um sistema com capacidade para se direcionar para o organelo de interesse. Assim sendo, o objetivo deste projeto é a criação e funcionalização de nanotransportadores baseados na conjugação de ADNp e compostos mitocondriotrópicos, adequados para uma entrega eficiente e direcionada de ADNp à mitocôndria.

Para atingir esse objetivo, o projeto foi dividido em duas partes: primeiro a síntese de nanopartículas à base de ADNp/PEI e ADNp/PEI/composto mitocondriotrópico (TPP e Rho123) com rácios N/P de 2 e 5 e concentrações de 2 e 4 mg/mL de composto mitocondriotrópico, caracterização dos diferentes nanosistemas e comparação dos mesmos; e de seguida, avaliação *in vitro* dos diferentes sistemas com estudos de transfeção e de co-localização por microscopia confocal.

O sucesso deste trabalho baseia-se no estudo comparativo dos diferentes nanosistemas de modo a perceber qual poderá representar o vetor mais adequado para possíveis avanços na entrega de genes mitocondriais, contribuindo para o desenvolvimento e evolução de terapias direcionadas à mitocôndria.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Materiais

Rodamina 123, isotiocianato de fluoresceína (FITC), polietilenimina (PEI), paraformaldeído (PFA) e cloreto de sódio anidro da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Brometo de bromometil trifetilfosfónio (TPP) da Acros organics. Tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) da Merck. Agarose e *Green Safe* obtido à empresa NZYTech Lda. (Lisboa, Portugal). Sonda DAPI para marcação do núcleo e sonda Mitotracker® Orange CMTMROS e adquiridas à empresa ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Etanol 100% da fábrica de álcool Manuel Vieira & C^a (Irmão) Sucrs, Lda. (Torres Novas, Portugal). Meio de cultura celular DMEM adquirido à empresa Biochrome AG (Alemanha).

A linha celular de cancro do cólo do útero (HeLa) foi adquirida à empresa ATCC (Middlesex, U.K.). O plasmídeo pCAG-mtND1 foi produzido por um protocolo experimental desenvolvido pelo grupo [1].

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese e caracterização de nanopartículas

3.2.1.1 Síntese de nanopartículas à base de ADNp/PEI

Inicialmente foi preparada uma solução contendo tampão acetato de sódio e ADNp (pCAG-mtND1) com uma concentração de, aproximadamente, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Para preparar as nanopartículas sem o composto mitocondriotrópico, pipetou-se para cada eppendorf 400 μL da solução inicial de ADNp; com os compostos mitocondriotrópicos (TPP e Rho123) pipetou-se 200 μL da solução inicial e 200 μL do composto dissolvido em tampão acetato de sódio com concentrações de 2 e 4 mg/mL . Posteriormente, adicionou-se gota-a-gota durante 40 s e em agitação 100 μL de polímero PEI a cada eppendorf e deixamos em agitação por mais 20 s após esta adição. De seguida, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente durante 15 minutos e depois procedeu-se a uma centrifugação de 20 minutos a 10 000 g e a 25°C.

Assim, obtiveram-se 10 amostras diferentes de nanopartículas, que se enumeram: ADNp/PEI rácio 2; ADNp/PEI rácio 5; ADNp/PEI rácio 2/TPP [2 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 2/TPP [4 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 5/TPP [2 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 5/TPP [4 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 2/Rho123 [2 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 2/Rho123 [4 mg/mL]; ADNp/PEI rácio 5/Rho123 [2 mg/mL] e ADNp/PEI rácio 5/Rho123 [4 mg/mL].

3.2.1.2 Morfologia das nanopartículas

Formadas as nanopartículas, o *pellet* foi recuperado e lavado 5 vezes com 200 µL de água desionizada, purificada com um sistema Mili-Q da Millipore (Billerica, MA, E.U.A.), e entre cada lavagem foi feita uma centrifugação de 12 minutos a 13 000 rpm. Depois da última centrifugação o *pellet* foi ressuspenso em 40 µL de tungstênio 1%. Posteriormente, procedeu-se a uma diluição de 1:20 de cada amostra em água desionizada e 10 µL dessa diluição foi colocada sobre uma lamela redonda de 10 mm de diâmetro e deixada durante a noite à temperatura ambiente para secar.

No dia seguinte, as amostras foram revestidas com ouro por pulverização catódica usando um equipamento de revestimento por aspersão Emitech K550 (Londres, Inglaterra) e analisadas por microscópio eletrônico de varrimento (Hitachi S-2700, Tóquio, Japão), operadas a uma voltagem de 20 kV com ampliações variáveis.

3.2.1.3 Eficiência de encapsulação do ADNp

A eficiência de encapsulação (EE) permite determinar se o ADNp foi encapsulado na nanopartícula de forma eficiente. A EE foi determinada após centrifugação, seguindo o método descrito em 2.1.1., e recuperação do sobrenadante. O sobrenadante contém o ADNp que não foi encapsulado nas nanopartículas.

A concentração de ADNp não encapsulado foi determinada por análise UV-vis a 260 nm num nanofotômetro (Implen, Munich, Alemanha).

Para fazer a marcação do branco foi usado tampão acetato de sódio no caso das nanopartículas sem composto mitocôndriotrópico e no caso das nanopartículas contendo TPP e Rho123 usou-se uma mistura em partes iguais do mesmo tampão com o respectivo composto. Foram realizadas pelo menos três medições independentes de cada amostra.

Para determinar os valores da EE recorreu-se à seguinte fórmula:

$$EE (\%) = \frac{ADNp_{total} - ADNp_{n\tilde{a}o\ encapsulado}}{ADNp_{total}} \times 100 \quad (1)$$

Onde $ADNp_{total}$ é a concentração de ADNp usado para formar as nanopartículas e $ADNp_{n\tilde{a}o\ encapsulado}$ é a concentração de ADNp obtida no sobrenadante.

3.2.1.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose foi realizada para confirmar a eficiência de encapsulação do ADNp.

Foi realizada uma eletroforese horizontal em gel de agarose a 1% e 1 µg/mL de Green Safe e corrida a 120 V por 30 minutos em tampão TAE (40 mM Tris base, 20 mM de ácido acético e 1 mM EDTA, pH 8,0). O gel foi visualizado com recurso à exposição a luz ultravioleta (UV) no equipamento Uvitec Cambridge FireReader equipado com uma câmara UV (UVITEC Cambridge, Cambridge, Reino Unido).

3.2.1.5 Eficiência de encapsulação da Rho123

De forma similar ao cálculo da taxa de encapsulação do ADN plasmídico, a eficiência de encapsulação de rodamina foi determinada através da seguinte equação:

$$EE (\%) = \frac{Rho123_{total} - Rho123_{n\tilde{a}o\ encapsulada}}{Rho123_{total}} \times 100 \quad (2)$$

A quantidade de Rho não incorporada foi determinada através de espectrofotometria de absorção usando cuvettes de quartzo de 1cm num espectrofotómetro Shimadzu UV-vis 2100. As amostras de Rho foram dissolvidas em etanol. O coeficiente de extinção molar, (ϵ), é $85.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 511 nm. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram, respectivamente, 480 nm e 511 nm. A concentração de rodamina em cada amostra foi determinada espectrofotometricamente por meio da construção de uma curva de calibração.

3.2.1.6 Tamanho das nanopartículas e Potencial Zeta (ζ)

As nanopartículas foram sintetizadas seguindo o método descrito em 3.2.1.1. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 600 µL de água mili-Q.

O tamanho médio das partículas e as cargas de superfície (potencial zeta) foram determinados a 25°C usando um Zetasizer nano ZS. Dispersão dinâmica de luz usando um laser He-Ne de 633 nm com ótica não-invasiva de retroespalhamento e espalhamento de luz eletroforético usando a técnica de laser M3-PALS (análise de fase de espalhamento de luz) foram aplicadas para avaliação do tamanho das partículas e das cargas de superfície, respetivamente. Foi usado o software Malvern zetasizer v 6.34. Os valores médios de tamanho e potencial zeta foram calculados com os dados obtidos a partir de três medições \pm desvio padrão.

3.2.2 Crescimento e manutenção da cultura celular

Linha celular de células de cancro do colo do útero previamente congeladas foi retirada do armazenamento criogênico e descongelada em banho-maria a 37°C. Imediatamente após as células serem descongeladas, foram semeadas num frasco de cultura estéril de 75 cm² com a ajuda de uma pipeta serológica estéril de 1 mL. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 0,5 g de bicarbonato de sódio por litro, 1,10 g de HEPES/L e 100 g/mL de estreptomina e 100 unidades por mL de penicilina (Sigma), e o frasco foi colocado na incubadora a 37°C, 5% CO₂ e 90% de humidade para um crescimento celular adequado. Quando o meio começou a mudar de uma cor rosa para uma cor mais alaranjada/amarelada, foi substituído por 10 mL de meio novo para reabastecer os nutrientes e remover quaisquer células mortas soltas. A cultura celular foi então monitorizada diariamente e tipicamente, o meio foi substituído a cada 2 ou 3 dias. O crescimento foi realizado até cerca de 90% da confluência ter sido atingida. Neste ponto, as células são usadas para realizar experimentos laboratoriais ou são subcultivadas em novos frascos de cultura de 75 cm² suplementados com 10 mL de meio.

Para colher as células, primeiramente o meio foi trocado por uma solução de PBS (NaCl 8 g/L, KCl 0,2 g/L, Na₂HPO₄, 2 H₂O 1,8 g/L, KH₂PO₄ 0,3 g/L com um pH 7,4) para remover quaisquer células mortas e detritos que possam existir. Posteriormente, a solução de PBS foi removida e 3 mL de solução de tripsina recentemente descongelada foi adicionada para promover o descolamento das células vivas que estivessem agarradas ao fundo do frasco. Após 3 min, foi adicionado 3 mL de meio para interromper o efeito da tripsina seguindo-se uma pequena centrifugação de 5 minutos a 360 g e 25°C. O *pellet* contendo as células vivas foi recuperado.

Para determinar o número de células vivas, o *pellet* recuperado foi suavemente suspenso em 5 mL de novo meio. Em seguida, uma pequena amostra de 20 µL foi coletada e misturada com 20 µL de azul tripano. As células vivas foram então contadas com a ajuda de uma câmara de Neubauer, onde cada ponto branco representava uma célula viva.

Usando a seguinte fórmula, fomos capazes de estimar o número de células vivas:

$$n^{\circ} \text{ de células por mL} = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10^4 \quad (3)$$

Neste caso o fator de diluição é 2, porque o volume total após a diluição é 40 µL e o volume de amostra antes da diluição é 20 µL.

3.2.3 Marcação do plasmídeo com FITC

Para cada amostra de nanopartículas, cerca de 2,5 µg de ADNp (a uma concentração de 100 µg/mL) foi marcado com o composto fluorescente FITC. A quantidade de plasmídeo a marcar está relacionada com a área de crescimento do poço das placas a serem utilizadas, neste caso vão ser usadas para estudos *in vitro* placas de 24 poços em que cada poço possui uma área de crescimento de cerca de 1,91 cm².

Assim sendo, para cada amostra de nanopartículas foi misturado num eppendorf cerca de 25 µL de ADNp, 2 µL de FITC e 56,8 µL de *labeling buffer* (0,020 g de Na₂B₄O₇ por mL de água desionizada), perfazendo um volume total de 85 µL. De seguida, os eppendorfs contendo a mistura foram colocadas em agitação durante 4 h num agitador de eppendorfs (Programmable rotator-mixer, StarLab), à temperatura ambiente e protegido da luz. Passadas as 4 h de agitação, adicionou-se a cada eppendorf 1 volume (85 µL) de NaCl 3M e 2,5 volumes (212,5 µL) de etanol 100% e incubou-se a -20 °C até ao dia seguinte.

No dia seguinte procedeu-se a uma centrifugação a 4 °C durante 30 minutos a 12 000 g, e de seguida descartou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com 400 µL de etanol 75%, 2 ou 3 vezes até este deixar de se apresentar com uma cor laranja forte. Entre cada lavagem procedeu-se a uma centrifugação de 10 minutos, a 12 000 g e 4 °C. Após a última centrifugação o plasmídeo encontra-se marcado e pronto para a preparação das nanopartículas para posteriores estudos de microscopia confocal.

3.2.4 Estudo de transfeção *in vitro*

Para estudos de transfeção, as células foram semeadas em placas de 24 poços, contendo lamelas redondas, a uma densidade de 5x10⁴ células/poço em 600 µL de meio DMEM completo (com soro e antibiótico). Quando 90% da confluência foi atingida, o meio completo foi substituído por meio incompleto (sem soro e sem antibiótico) e as células foram incubadas a 37 °C numa atmosfera de 90% de humidade e 5% de CO₂, durante pelo menos 12 h para permitir a transfeção.

Estando as células aptas para transfeção e o plasmídeo marcado com FITC, preparou-se as nanopartículas adicionando o tampão acetato de sódio, o composto mitocondriotrópico e o polímero, e após a centrifugação descrita no método 2.1.1. descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 300 µL de Opti-MEM. O meio incompleto das células foi substituído, novamente, por meio completo e dos 300 µL de amostra obtidos após a ressuspensão do *pellet*, 100 µL foram adicionados a cada poço, obtendo assim triplicados de cada amostra.

Após 6 h de período de incubação após a transfeção, as células foram coradas com 100 nM de Mitotracker laranja CMTMROS por um período de 45 minutos a 37°C. As sondas MitoTracker, que se difundem passivamente através da membrana plasmática, só se podem

acumular nas mitocôndrias ativas. Uma vez que as mitocôndrias são coradas, as células podem ser tratadas para estudos de microscopia confocal.

3.2.5 Microscopia confocal de fluorescência

Após a transfeção e coloração da mitocôndria com a sonda MitoTracker, o meio celular de cada poço foi descartado e as células foram lavadas 3 vezes com PBS.

Posteriormente, incubaram-se as células com 1 mL de PFA 4%, durante 10 minutos para manter a estrutura celular e fixar as células. Passados os 10 minutos descartou-se o PFA e lavou-se novamente as células 3 vezes com PBS e de seguida o núcleo da célula foi corado por incubação das células com 60 µL da sonda DAPI (1 µM), durante 10 minutos. Por fim, o DAPI foi descartado e as células foram, novamente, lavadas 3 vezes com PBS.

As células foram então montadas colocando as lamelas de forma arredondada numa lâmina com a ajuda da solução de Entellan e visualizadas através de microscopia confocal (ZEISS LSM 710, Oberkochen, Alemanha).

De modo a manter a eficácia dos corantes, todos os procedimentos após a transfeção com as nanopartículas, incluindo a preparação das mesmas com o ADNp marcado, foram realizados na ausência de luz.

O comprimento de onda de excitação e emissão das sondas estão indicados na tabela a seguir (tabela 2).

Tabela 2 - Comprimentos de onda de excitação e emissão das diferentes sondas usadas na microscopia confocal.

Sonda	Excitação (nm)	Emissão (nm)
Rodamina 123	505	560
DAPI	340	488
FITC	490	525
Mitotracker Orange CMTMROS	554	576

Capítulo 4 - Resultados

4.1 Morfologia das nanopartículas

De maneira a avaliar a morfologia e o tamanho das nanopartículas foi usada a técnica de microscopia eletrônica de varrimento que utiliza um feixe de elétrons altamente energéticos para fornecer informações sobre a topografia e morfologia de objetos a uma escala muito pormenorizada. Neste caso, permite-nos compreender alguns aspetos importantes dos diferentes sistemas, tais como a forma, tamanho e propriedades da superfície. Foram avaliados vetores de ADNp/PEI, a dois valores diferentes de rácio N/P, e vetores funcionalizados com TPP e Rho123. As imagens obtidas são mostradas na figura 15.

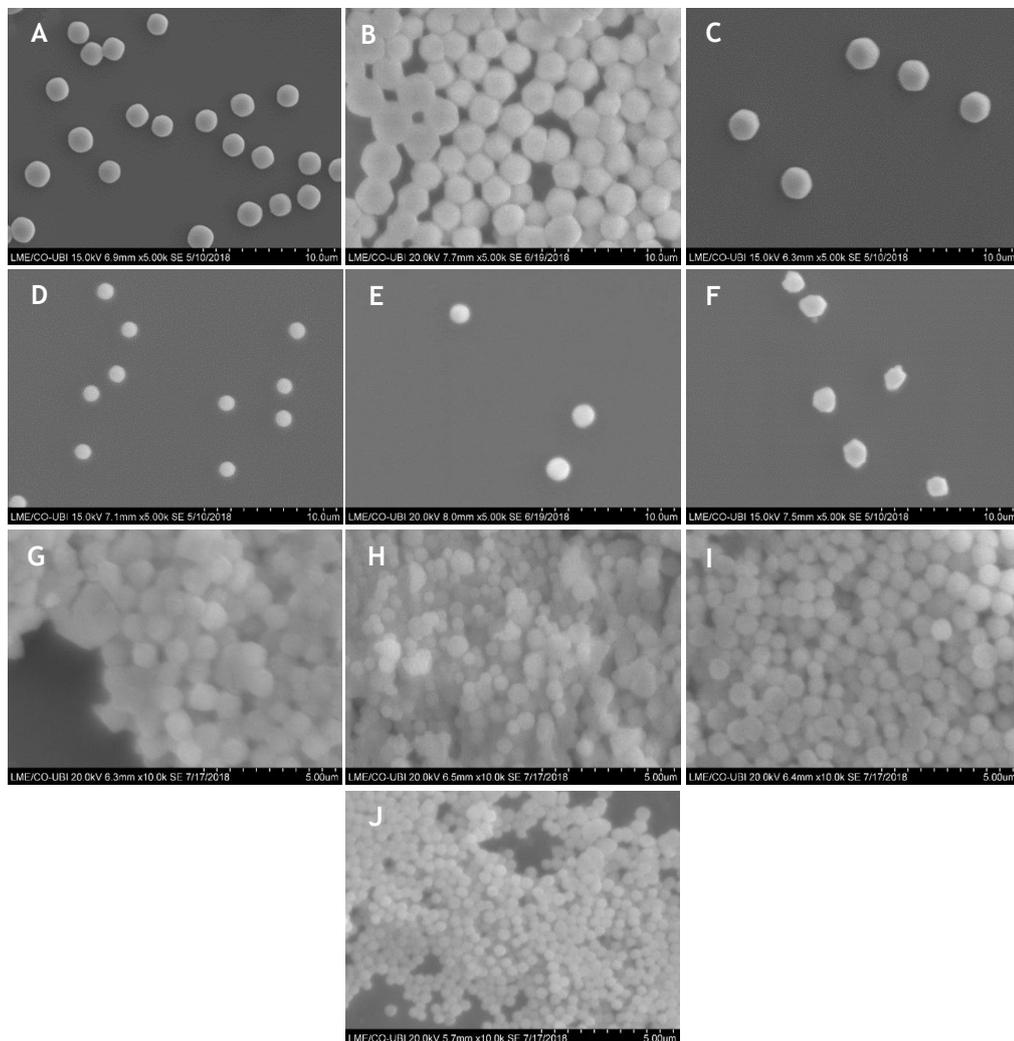


Figura 15 - Imagens de Microscopia Eletrônica de Varrimento obtidas para nanopartículas baseadas em ADNp/PEI e em ADNp/PEI/composto mitocondriotrópico, com diferentes ampliações. A) ADNp/PEI com rácio N/P de 2; B) ADNp/PEI com rácio N/P de 5; C) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/TPP 2 mg/mL; D) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/TPP 4 mg/mL; E) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/TPP 2 mg/mL; F) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/TPP 4 mg/mL; G) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/Rho123 2 mg/mL; H) ADNp/PEI com rácio N/P de 2/Rho123 4 mg/mL; I) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/Rho123 2 mg/mL; J) ADNp/PEI com rácio N/P de 5/Rho123 4 mg/mL.

As imagens de microscopia eletrônica de varrimento exibem nanopartículas, de forma geral, oval ou arredondada e com tamanhos inferiores a 500 nm. Os sistemas com rácio N/P de 2 sem composto mitocondriotrópico e com TPP, apresentam uma forma mais esférica e regular, enquanto que os sistemas com o mesmo rácio e com a Rho123 apresentam uma maior polidispersidade, uma forma mais irregular e a agregação é evidente. Os vetores formulados com rácio N/P de 5, com e sem os compostos mitocondriotrópicos apresentam, de forma geral, uma morfologia irregular, com visível agregação aparentando ser também mais polidispersos.

4.2 Tamanho das nanopartículas

O tamanho é uma propriedade importante dos nanosistemas. Para obter informação relativa ao tamanho médio dos diferentes vetores recorreremos à técnica de espalhamento dinâmico de luz (Dynamic Light Scattering) e ao equipamento Zetasizer nano ZS e os resultados estão representados na tabela 3.

Tabela 3 - Tamanho médio do ADN plasmídico e dos diferentes nanosistemas. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).

Nanopartículas	N/P	Tamanho (nm)
ADNp	-	667 \pm 7.9
ADNp/PEI	2	288 \pm 6.5
ADNp/PEI	5	151 \pm 4.6
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	2	242 \pm 2.9
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	2	283 \pm 6.4
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	5	133 \pm 4.2
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	5	117 \pm 1.9
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	2	257 \pm 8.6
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	2	278 \pm 5.5
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	5	154 \pm 6.1
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	5	169 \pm 4.8

Nos sistemas sem composto mitocondriotrópico, pode observar-se que os vetores formulados a rácio 5 têm um tamanho significativamente menor (151 nm) do que os sistemas preparados a um rácio de 2 (288 nm). O mesmo acontece com as nanopartículas que incluem o composto mitocondriotrópico. Tanto no caso dos sistemas com TPP como naqueles contendo Rho123, verifica-se uma diminuição significativa do tamanho das nanopartículas quando se usa o rácio 5 em vez do rácio 2.

Quanto à influência da concentração de TPP ou de Rho123 no tamanho dos veículos, verifica-se que as nanopartículas possuem tamanhos mais reduzidos quando se usa uma concentração de composto de 2 mg/mL, com exceção dos sistemas com TPP e rácio N/P de 5 em que o tamanho das nanopartículas é maior com uma concentração de composto de 2 mg/mL.

Como termo de comparação, apresenta-se também o tamanho do ADNp, que apresenta um tamanho de 667 nm.

4.3 Potencial ζ

A carga superficial das partículas sintetizadas foi avaliada. Na tabela 4 encontram-se representados os valores do potencial zeta para cada nanosistema em estudo.

Tabela 4 - Potencial zeta do ADNp e dos diferentes nanosistemas. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).

Nanopartículas	N/P	Potencial ζ (mV)
ADNp	-	-98 \pm 3.1
ADNp/PEI	2	+21 \pm 0.9
ADNp/PEI	5	+29 \pm 3.3
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	2	+33 \pm 5.7
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	2	+36 \pm 4.0
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	5	+40 \pm 1.3
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	5	+47 \pm 2.5
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	2	+21 \pm 2.7
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	2	+23 \pm 1.8
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	5	+39 \pm 4.6
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	5	+42 \pm 5.2

Todos os sistemas apresentam uma carga de superfície positiva, a variar entre os 20 e os 50 mV. Os vetores ADNp/PEI possuem valores de potencial zeta ligeiramente mais elevados quando é usado o rácio N/P de 5 do que quando é usado o rácio de 2. Nos sistemas contendo o agente mitocondriotrópico, TPP ou Rho123, podemos observar uma carga de superfície mais elevada também para os sistemas com rácio N/P de 5.

Quanto à influência da concentração de composto mitocondriotrópico na carga de superfície das nanopartículas, podemos observar que, de forma geral, a presença tanto de TPP como de Rho123 provoca um ligeiro aumento do potencial ζ , aumento esse que é mais visível quando é usada uma concentração de 4 mg/mL de composto.

Como termo de comparação, temos o valor do potencial apenas para o ADNp que é de cerca de -98 mV.

4.4 Eficiência de encapsulação

De maneira a atingir os objetivos terapêuticos pretendidos é necessário que uma quantidade significativa de plasmídeo atinja o alvo pretendido. A eficiência de encapsulação (EE) permite-nos avaliar se o plasmídeo foi incorporado de forma eficiente nas nanopartículas. Na tabela 5 encontram-se representadas as EE do ADNp que foram calculadas para todos os nanosistemas em estudo e a EE da Rho123 para os sistemas que possuem o

composto. Todos os sistemas apresentam valores de EE do ADNp superiores a 70%. As nanopartículas formuladas tendo em conta um rácio N/P de 5 atingem taxas de encapsulação de ADNp superiores a 80%, enquanto que as nanopartículas de rácio 2 apresentam valores inferiores. A presença do agente mitocondriotrópico parece não afetar a encapsulação do plasmídeo nos veículos poliméricos.

Para confirmar a eficiência de encapsulação do plasmídeo foi realizado um gel de eletroforese (figura 16) onde se utilizou uma amostra de ADNp como controlo. A não existência de bandas correspondentes ao ADNp, para todos os sistemas estudados, sugere que a formação das nanopartículas promove uma eficiência de encapsulação de ADNp elevada.

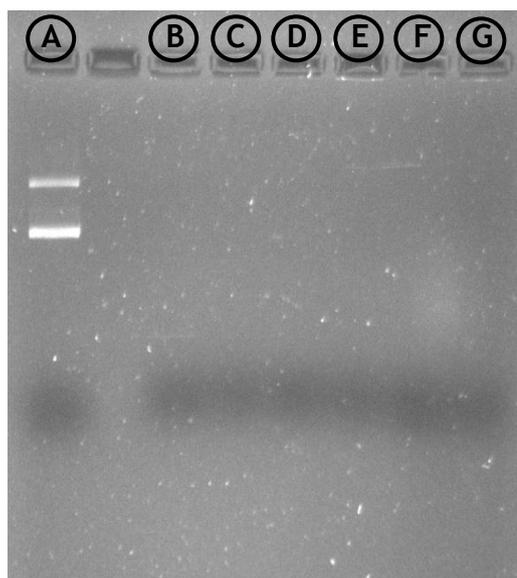


Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose que comprova a eficiência de encapsulação do plasmídeo. A) ADNp; B) ADNp/PEI rácio N/P de 2; C) ADNp/PEI rácio N/P de 5; D) ADNp/PEI rácio N/P de 2/ [2 mg/mL] de TPP; E) ADNp/PEI rácio N/P de 2/ [4 mg/mL] de TPP; F) ADNp/PEI rácio N/P de 5/ [2 mg/mL] de TPP; G) ADNp/PEI rácio N/P de 5/ [4 mg/mL] de TPP.

Tabela 5 - Eficiência de encapsulação do plasmídeo para os diferentes nanosistemas e da rodamina para os sistemas que incorporam o composto. Os resultados foram obtidos através de três medidas independentes (média \pm desvio padrão, n=3).

Nanopartículas	N/P	Eficiência de Encapsulação (%)	
		ADNp	Rho123
ADNp/PEI	2	74 \pm 3.9	-
ADNp/PEI	5	83 \pm 5.2	-
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	2	76 \pm 2.9	-
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	2	77 \pm 2.1	-
ADNp/PEI/TPP [2 mg/mL]	5	82 \pm 6.8	-
ADNp/PEI/TPP [4 mg/mL]	5	85 \pm 4.3	-
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	2	78 \pm 7.3	70 \pm 1.9
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	2	77 \pm 4.6	73 \pm 2.0
ADNp/PEI/Rho123 [2 mg/mL]	5	83 \pm 5.9	74 \pm 5.3
ADNp/PEI/Rho123 [4 mg/mL]	5	84 \pm 2.2	78 \pm 4.5

Quanto aos sistemas baseados em ADNp e Rho123, todos eles apresentam uma EE do composto superior a 70%, e parece haver uma ligeira influência da concentração de Rho123 na sua taxa de encapsulação, sendo que a EE aumenta ligeiramente quando se aumenta a concentração do composto. O rácio N/P de PEI parece não afetar a encapsulação da Rho123 nos vetores.

4.5 Ensaio *in vitro*

Sendo o objetivo deste trabalho direcionar as nanopartículas que contém o vetor de ADN para a mitocôndria, é necessário saber se a captação celular e internalização dos diferentes nanosistemas em estudo é possível e avaliar a eficácia de direcionamento para o organelo de interesse. Para tal recorreremos à microscopia confocal de fluorescência, nomeadamente, a estudos de co-localização com os núcleos e mitocôndrias corados com sondas fluorescentes. A figura 17 mostra imagens para o sistema ADNp/PEI rácio N/P de 5/Rho123 [4 mg/mL].

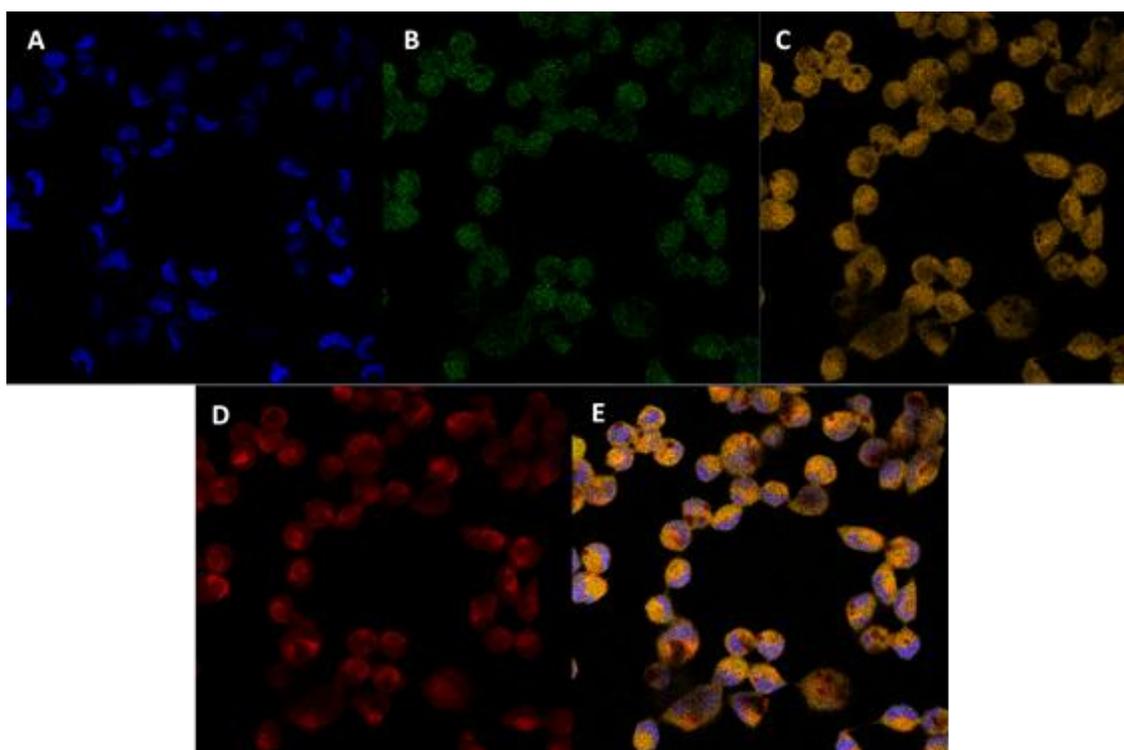


Figura 17 - Capacidade de transfeção e estudos de co-localização para as nanopartículas de ADNp/PEI rácio 5/Rho123 [4mg/mL]. A) Núcleos marcados a azul pela sonda DAPI; B) ADNp marcado a verde pela sonda FITC; C) Nanopartículas marcadas a laranja devido à presença de Rho123 na sua composição; D) Mitocôndrias marcadas a vermelho pela sonda Mitotracker Orange CMTMROS; E) Sobreposição de todas as imagens.

Como podemos observar, pela coloração verde proveniente do ADNp marcado com FITC visível na imagem B, as nanopartículas foram capazes de entrar e ser internalizadas nas células. A presença de rodamina, na imagem C, é outra evidência de internalização das

nanopartículas a da sua localização específica nas mitocôndrias. A sobreposição das várias imagens, complementada com a diferente coloração do núcleo e mitocôndria, permite detetar a presença dos vetores nas mitocôndrias das células. A imagem E sugere que a co-localização ocorre na mitocôndria e não no núcleo. Estes dados parecem ser consistentes com a afinidade do vetor pelas mitocôndrias das células e com a sua localização intracelular neste organelo.

O objetivo seguinte foi comparar a capacidade de transfeção e de direcionamento para a mitocôndria dos diferentes sistemas em estudo (figura 18).

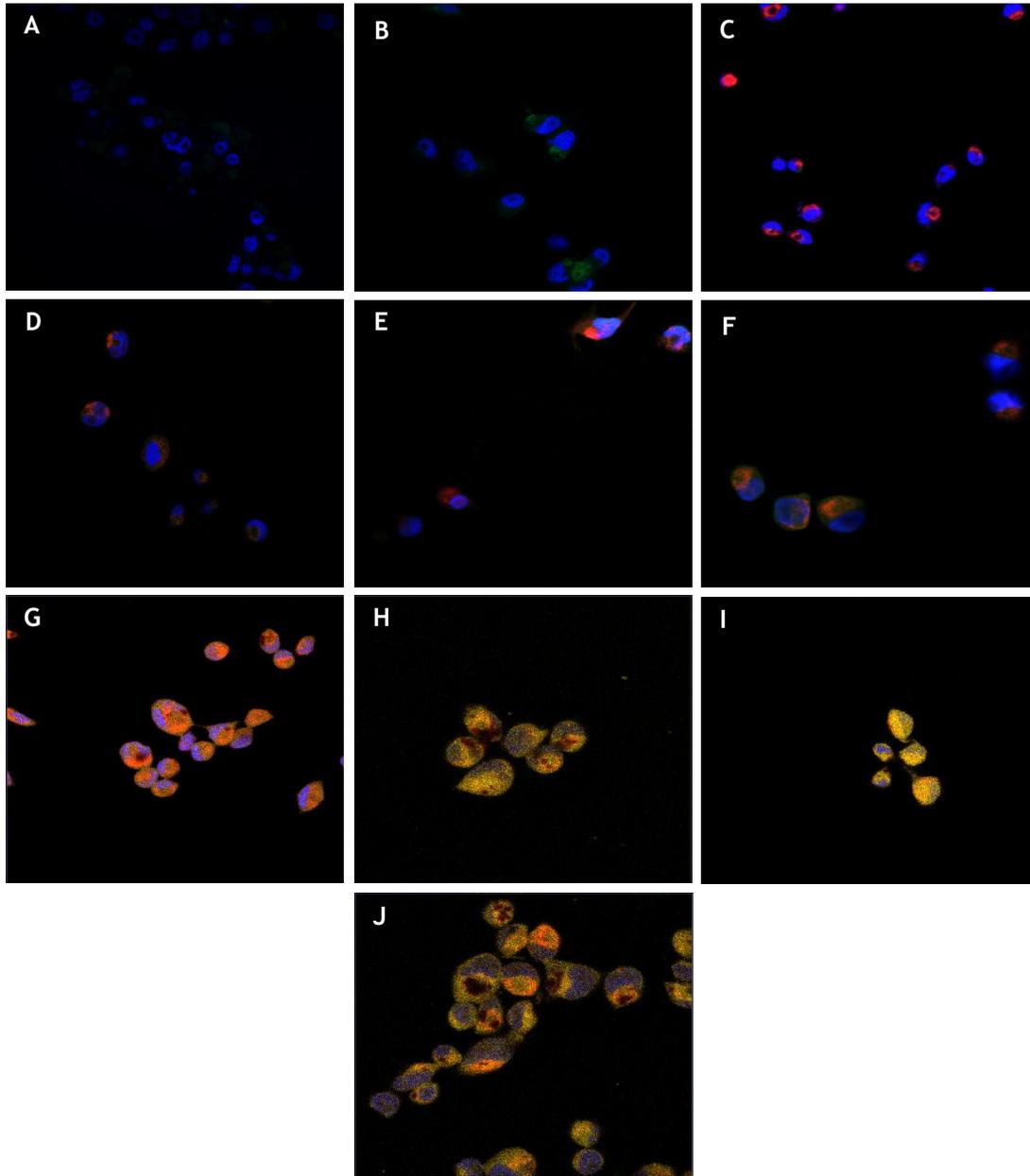


Figura 18 - Capacidade de transfeção e de direcionamento para a mitocôndria dos diferentes sistemas. A) ADNp/PEI rácio N/P de 2; B) ADNp/PEI rácio N/P de 5; C) ADNp/PEI rácio N/P de 2/TPP [2 mg/mL]; D) ADNp/PEI rácio N/P de 2/TPP [4 mg/mL]; E) ADNp/PEI rácio N/P de 5/TPP [2 mg/mL]; F) ADNp/PEI rácio N/P de 5/TPP [4 mg/mL]; G) ADNp/PEI rácio N/P de 2/Rho123 [2 mg/mL]; H) ADNp/PEI rácio N/P de 2/Rho123 [4 mg/mL]; I) ADNp/PEI rácio N/P de 5/Rho123 [2 mg/mL]; J) ADNp/PEI rácio N/P de 5/Rho123 [4 mg/mL].

Como podemos observar, todos os diferentes sistemas foram capazes de entrar nas células. Nas imagens A e B podemos ver com tonalidade verde as nanopartículas de ADNp/PEI que na ausência de um composto mitocondriotrópico se localizam no núcleo ou citoplasma das células. Nas imagens C, D, E e F que representam os vetores com TPP, podemos verificar uma sobreposição da cor laranja que representa a coloração das mitocôndrias com a cor verde que resulta da marcação do ADNp com FITC, o que nos permite afirmar que há uma co-localização das nanopartículas com as mitocôndrias. Nas imagens G, H, I e J relativas aos sistemas com Rho123, é visível uma sobreposição da cor vermelha proveniente da sonda MitoTracker, com a cor laranja que representa o composto Rho123 e com a cor verde que resulta da marcação do ADNp com FITC, o que também apoia a hipótese de que as nanopartículas se direcionam para as mitocôndrias.

Pelos resultados obtidos, é notória a evidência de que ocorreu transfeção celular para todos os diferentes nanosistemas e que no caso dos sistemas que possuem TPP ou Rho123 na sua composição, estes demonstram afinidade mitocondrial sendo direcionados para este organelo celular. Apesar destes dados promissores, e pela ausência de informação relativa à expressão da proteína mitocondrial, neste momento é difícil inferir de forma exata e inequívoca sobre a entrega efetiva do ADNp à mitocôndria. Estudos complementares serão realizados futuramente tendo como foco a expressão do gene de interesse e consequente produção da proteína.

Capítulo 5 - Discussão

A investigação no tratamento de doenças incuráveis tem vindo a ganhar um interesse exponencial nas últimas décadas. O genoma mitocondrial é particularmente vulnerável a mutações devido à sua proximidade dos locais de produção de ERO, o que provoca uma vasta gama de citopatias e doenças neuromusculares. No entanto, embora o conhecimento da mitocôndria e do ADNmt tenha vindo a crescer, ainda não existe nenhum fármaco específico que trate as doenças mitocondriais de forma eficaz e as opções de tratamento são limitadas e mal sucedidas. Assim, para corrigir e resolver essa lacuna, surge a TGM como uma abordagem inovadora no tratamento dessas mesmas doenças.

De modo a evoluirmos nesse sentido tentámos criar um vetor com afinidade pela mitocôndria que nos possa oferecer um conjunto de características adequadas à transfeção celular e direcionamento mitocondrial com vista à expressão do gene mitocondrial de interesse, para uso em aplicações de TGM.

Apesar da eficiência obtida com vetores virais, a sua antigenicidade, efeitos oncogénicos e instabilidade de armazenamento têm contribuído para o desenvolvimento de vetores não virais que oferecem muitas vantagens como a produção mais fácil e económica, resposta imunológica muito baixa e maior capacidade de carga de ADN [122], [127]. No que diz respeito à terapia de problemas oncológicos, um desafio para os vetores não virais é o direcionamento eficiente dos genes terapêuticos para o tecido tumoral. Uma vez que atingem o local, têm que ser capazes de se ligar às células-alvo e permitir a expressão do gene. Nos últimos anos têm-se vindo a desenvolver novas estratégias de direcionamento desses mesmos vetores para as células, baseadas em formulações lipossómicas, poliméricas e poliaminas [122]. O polímero PEI tem uma densidade de carga catiónica muito elevada, sendo um excelente promotor de complexos de ADN estáveis com tamanho e forma adequados. A capacidade desses agentes catiónicos de compactar e condensar o ADN depende da atração entre as hélices do ADN que medeiam, neutralizando as cargas dos grupos fosfato do ADN, tornando desfavoráveis as interações ADN-solvente. Além disso, eles podem carregar eficientemente tanto fármacos como genes e têm a capacidade de os libertar de forma controlada [122].

Neste projeto, o foco foi o desenvolvimento de um vetor com afinidade mitocondrial baseado num plasmídeo contendo um gene mitocondrial de interesse terapêutico. Deste modo, o projeto teve início com o desenho e formulação de nanopartículas poliméricas baseadas em ADNp e também compostos mitocondriotrópicos reconhecidos, como o TPP e a Rho123. Após a síntese, as nanopartículas à base de ADNp/PEI, ADNp/PEI/TPP e ADNp/PEI/Rho123 foram caracterizadas no que respeita à eficiência de encapsulação de ADNp e Rho123, morfologia, tamanho e carga de superfície. O PEI foi usado com o objetivo de promover a compactação do ADNp e a formação de complexos estáveis à escala nano,

enquanto que o TPP e a Rho123 foram usados com a finalidade de direcionar as nanopartículas para a mitocôndria.

Escolha do Plasmídeo e Formação dos vetores: Com o objectivo de apresentar um vetor mitocondrial viável para tratamento de doenças mitocondriais relacionadas com mutações no ADN mitocondrial, nos últimos anos o grupo liderado pela Prof.^a Diana Costa desenvolveu um plasmídeo contendo o gene mitocondrial ND1 que codifica a proteína NADH desidrogenase I do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Esta proteína tem enorme relevância no normal funcionamento da mitocôndria, sendo de grande interesse terapêutico [1]. Neste projeto de mestrado, o plasmídeo desenvolvido, pCAG-GFP-ND1 foi utilizado. Este ADNp foi encapsulado em nanopartículas poliméricas por interacção electrostática com o polímero PEI. Devido á grande densidade de carga do PEI, a simples adição de PEI ao ADNp levou á sua compactação em complexos nanométricos de elevada estabilidade. Este é um método fácil, simples e económico de formulação de sistemas de entrega. Os vetores foram formulados considerando diferentes rácios N/P, razão entre os grupos amina do PEI e os grupos fosfato de ADNp. O potencial do rácio N/P na manipulação das propriedades dos complexos desenvolvidos é hoje amplamente conhecido e tem sido explorado para melhorar as características de nanopartículas de PEI/ADNp [127]. Aos sistemas de PEI/ADNp foram adicionados os compostos TPP ou Rho123 na tentativa de incorporar agentes com afinidade mitocondrial nas nanopartículas poliméricas. Esta estratégia já revelou, anteriormente, ser válida na preparação de vetores com habilidade de direcionamento para a mitocôndria [131].

Propriedades dos sistemas: Relativamente às propriedades dos sistemas formulados, PEI/ADNp, PEI/ADNp/TPP e PEI/ADNp/Rho123, verificou-se que todos os vetores possuem forma esférica ou oval com tamanhos inferiores a 300 nm. Apesar de todos os sistemas apresentarem tamanhos inferiores a 300 nm, o que os torna capazes de atravessar os nanoporos existentes nas membranas celulares, os sistemas com rácio N/P de 5, independentemente da presença ou não de TPP e da concentração do mesmo, apresentam um menor tamanho, o que pode ser justificado tendo em consideração o valor mais elevado do rácio N/P utilizado na formação das nanopartículas. Um maior rácio que implica a presença de um maior número de grupos amina do PEI, leva a uma maior compactação do ADNp. Podemos confirmar isso ao verificar que o tamanho do ADNp sem o polímero é de cerca de 667 nm. Quando se trata da morfologia e recorrendo à microscopia eletrónica de varrimento, podemos afirmar que, de forma geral, as nanopartículas são arredondadas apesar de, em alguns casos apresentarem uma forma mais irregular, maior agregação e alguma polidispersidade em termos de tamanho, o que talvez pudesse ser resolvido filtrando as amostras.

Um aspeto relevante no desenvolvimento de novos vetores é a sua capacidade de incorporação de bioactivos. As taxas de eficiência de encapsulação de ADNp e Rho123 foram

determinadas para os vários sistemas estudados. Todas as formulações apresentaram uma eficiência de encapsulação de ADN superior a 70% e no caso dos sistemas com rácio N/P de 5 chega a atingir os 80%, o que os torna potenciais veículos de entrega em terapia génica. Foi possível determinar também a taxa de encapsulação do agente Rho123 para os sistemas incluindo este composto. Os valores de EE para a Rho123 foram também elevados, confirmando a incorporação eficiente deste composto fluorescente nas nanopartículas. A quantidade inicial de Rho123 afeta, apenas, subtilmente a EE.

Os valores de potencial zeta para os vários vetores foram determinados. Todos os sistemas apresentaram carga de superfície positiva sendo que, os sistemas com rácio N/P de 5 e TPP e os sistemas com concentração de 4 mg/mL de Rho123 apresentam os valores mais elevados, e, com exceção dos sistemas sem composto mitocôndriotrópico e dos sistemas com rácio N/P de 2 que incorporam a Rho123, todos apresentam carga de superfície superior a +30 mV, o que os torna capazes de permear eficientemente a membrana celular das células-alvo. Em termos de comparação temos o valor do potencial do ADNp (-98 mV), que pode ser explicado pelo facto de o ADN estar associado a histonas, que apresentam carga positiva e são responsáveis pela neutralização das cargas elétricas, ou seja, quando presentes anulam a carga negativa dos grupos fosfato do ADN. Uma vez que o ADNp não possui as referidas proteínas a sua carga de superfície será negativa.

De acordo com a literatura, nanopartículas com cargas de superfície superiores a +30 mV são consideradas fortemente catiónicas, o que favorece a capacidade de entrada nas células, uma vez que a membrana celular possui carga negativa [132]. Para além da carga de superfície, também a morfologia e o tamanho são parâmetros importantes, e o equilíbrio entre todas essas propriedades pode determinar a eficiência de internalização celular do vetor e a eficiência de transfeção génica [131], [133]. Quanto mais pequenas forem as nanopartículas mais rápida é a capacidade de difusão e mais facilmente atingem as células-alvo onde podem exercer o seu efeito terapêutico [131]. Estudos demonstram que nanopartículas esféricas, carregadas positivamente e com tamanhos inferiores a 300 nm geralmente favorecem a captação celular, no entanto as características ótimas dos vetores para uma eficiente captação celular podem variar de acordo com o tipo de célula [134]. A eficiência de encapsulação do plasmídeo é também um parâmetro essencial na caracterização de nanosistemas terapêuticos, uma vez que é indispensável que uma quantidade elevada de ADNp seja encapsulada para que a expressão génica possa ser promovida e a proteína de interesse terapêutico devidamente sintetizada e, assim, se obtenha o efeito desejado.

Estudos de transfeção *in vitro*: Numa segunda fase do projeto procedemos a estudos de transfeção *in vitro* e de co-localização por microscopia confocal de fluorescência, onde o núcleo e as mitocôndrias foram corados com sondas fluorescentes adequadas e o plasmídeo foi marcado com o composto fluorescente FITC.

Todos os diferentes sistemas apresentam uma boa capacidade de captação e internalização celular. O processo de internalização celular ocorre por endocitose, em que o ambiente ácido dos endossomas permite que as nanopartículas se dissolvam e libertem o composto bioativo que transportam no interior da célula [1], [132].

O processo de transfeção foi bem sucedido com todos os sistemas e podemos observar que na ausência de composto com afinidade para a mitocôndria estes se localizam no citoplasma ou no núcleo, e os sistemas com o composto mitocôndriotrópico se localizam nas mitocôndrias.

Na ausência de agentes mitocôndriotrópicos, as nanopartículas são capazes de ultrapassar a membrana celular e serem internalizadas por endocitose. O pH intracelular irá favorecer a ruptura dos endossomas dando-se conseqüentemente a libertação do ADNp no citoplasma. Para que o ADNp possa ser integrado no núcleo, terá de ultrapassar a barreira nuclear. Durante o processo de divisão celular, este mecanismo é facilitado uma vez que os poros nucleares abrem, permitindo que o ADNp chegue ao núcleo da célula [131], [132]. Contudo, o gene transportado por estes vetores não poderia ser expresso no núcleo, uma vez que pertence apenas ao genoma mitocondrial que é diferente do genoma nuclear [132].

Na presença dos compostos mitocôndriotrópicos, as nanopartículas adquirem propriedades de afinidade mitocondrial, nomeadamente a lipofilicidade que lhes permite atravessar a membrana plasmática e mitocondrial [129], [131], e que explica a co-localização dos sistemas na mitocôndria. Como a mitocôndria possui o seu próprio genoma e a maquinaria própria para produção de proteínas mitocondriais, será expectável que a incorporação, na mitocôndria, de um plasmídeo contendo um gene mitocondrial resulte na expressão da proteína de interesse. No entanto, não é possível neste momento a apresentação de resultados da expressão do gene de interesse e conseqüente produção da proteína. Estudos posteriores e em curso poderão num futuro próximo apresentar respostas neste tema.

Capítulo 6 - Conclusões e Perspetivas Futuras

A terapia génica mitocondrial pode ser uma abordagem bastante promissora para restabelecer a função mitocondrial em células mutadas e com deficiente funcionamento da cadeia respiratória. Para que a terapia génica mitocondrial possa ser considerada válida e realizável em contexto clínico, este tópico de investigação ainda necessita de evoluir no sentido da obtenção de um vetor com afinidade mitocondrial, capaz de entregar às mitocôndrias um gene mitocondrial de interesse terapêutico para expressão de uma proteína funcional. Deste modo, o normal funcionamento da mitocôndria poderá ser restabelecido e esta estratégia poderá ser uma aposta promissora no tratamento das diversas desordens mitocondriais que afectam milhares de pacientes em todo o Mundo. Na tentativa de oferecer um contributo significativo nesta área de investigação, ainda pouco explorada, este projeto teve como objetivo primordial a formulação de um sistema baseado em ADNp com afinidade mitocondrial.

Vetores poliméricos à base de PEI/ADNp e agentes mitocondriotrópicos, rodamina 123 e trifenilfosfónio, foram desenvolvidos e as suas propriedades (morfologia, tamanho, potencial zeta e capacidade de encapsulação de bioactivos) foram avaliadas. Estes nanosistemas biocompatíveis apresentaram morfologia esférica ou oval, tamanhos adequados para fins de terapia génica, valores positivos de potencial zeta e boas taxas de encapsulação de ADN plasmídico. Além disso, os vetores de ADNp podem ser facilmente internalizados em células de cancro do colo do útero e a microscopia confocal de fluorescência confirmou a entrega direccionada dos sistemas às mitocôndrias. Portanto, o objetivo de criação de um novo sistema a ser aplicado na área da terapia génica mitocondrial, foi alcançado.

De entre todos os vetores desenvolvidos, o que parece mais adequado para uso em terapia génica mitocondrial é o sistema ADNp/PEI com rácio N/P de 5/TPP 4 mg/mL, uma vez que é o que possui uma morfologia mais arredondada e sem aglomerados, tamanhos mais pequenos, maior eficiência de encapsulação do plasmídeo, potencial zeta mais positivo e também mostrou uma eficiente capacidade de transfeção e internalização celular.

Num futuro próximo, seria de valor testar a capacidade de internalização celular e transfeção dos vetores desenvolvidos noutros tipos de células. Proceder à separação/isolamento das mitocôndrias das restantes fracções celulares e seguir a fluorescência do ADNp-FITC poderá ser útil como forma de monitorizar a eficiência de transfeção e identificar a co-localização intracelular das nanopartículas.

Por outro lado, a avaliação da expressão do gene, por meio de técnicas de PCR poderá trazer informação relevante acerca da eficiência de transfeção e da possível produção da proteína mitocondrial de interesse. De seguida, e na eventual presença de transcritos,

estudos complementares (por exemplo, *western blot*) serão necessários para averiguar a presença da proteína e proceder à sua quantificação.

Bibliografia

- [1] E. Coutinho, C. Batista, F. Sousa, J. Queiroz, and D. Costa, "Mitochondrial Gene Therapy: Advances in Mitochondrial Gene Cloning, Plasmid Production, and Nanosystems Targeted to Mitochondria," *Mol. Pharm.*, vol. 14, no. 3, pp. 626-638, 2017.
- [2] S. Anderson *et al.*, "Sequence and organization of the human mitochondrial genome," *Nature*, vol. 290, no. 5806, pp. 457-465, 1981.
- [3] D. K. Dowling, "Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 4, pp. 1393-1403, 2014.
- [4] S. R. Doyle and C. K. Chan, "Mitochondrial Gene Therapy: An Evaluation of Strategies for the Treatment of Mitochondrial DNA Disorders," *Hum. Gene Ther.*, vol. 19, no. 12, pp. 1335-1348, 2008.
- [5] Y. Touchefeu, K. J. Harrington, J. P. Galmiche, and G. Vassaux, "Review article: Gene therapy, recent developments and future prospects in gastrointestinal oncology," *Aliment. Pharmacol. Ther.*, vol. 32, no. 8, pp. 953-968, 2010.
- [6] D. Vercauteren, J. Rejman, T. F. Martens, J. Demeester, S. C. De Smedt, and K. Braeckmans, "On the cellular processing of non-viral nanomedicines for nucleic acid delivery: Mechanisms and methods," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 566-581, 2012.
- [7] S. Hacein-Bey-Abina *et al.*, "A Serious Adverse Event after Successful Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency," *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, no. 3, pp. 255-256, 2003.
- [8] W. Wang, W. Li, N. Ma, and G. Steinhoff, "Non-Viral Gene Delivery Methods," *Curr. Pharm. Biotechnol.*, vol. 14, no. 1, pp. 46-60, 2013.
- [9] D. W. Pack, A. S. Hoffman, S. Pun, and P. S. Stayton, "Design and development of polymers for gene delivery," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 4, no. 7, pp. 581-593, 2005.
- [10] M. A. Mintzer and E. E. Simanek, "Nonviral vectors for gene delivery," *Chem. Rev.*, vol. 109, no. 2, pp. 259-302, 2009.
- [11] M. Neu, D. Fischer, and T. Kissel, "Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethylene imine) and its derivatives," *J. Gene Med.*, vol. 7, no. 8, pp. 992-1009, 2005.
- [12] Z. Dai and C. Wu, "How Does DNA Complex with Polyethylenimine with Different Chain Lengths and Topologies in Their Aqueous Solution Mixtures?," *Macromolecules*, 2012.
- [13] W. T. Godbey, K. K. Wu, and A. G. Mikos, "Size matters : Molecular weight affects the efficiency of poly (ethylenimine) as a gene delivery vehicle," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 268-275, 1998.
- [14] S. Adhya, B. Mahato, S. Jash, S. Koley, G. Dhar, and T. Chowdhury, "Mitochondrial

- gene therapy: The tortuous path from bench to bedside,” *Mitochondrion*, vol. 11, no. 6, pp. 839-844, 2011.
- [15] P. Yu-Wai-Man, P. G. Griffiths, and P. F. Chinnery, “Mitochondrial optic neuropathies - Disease mechanisms and therapeutic strategies,” *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 30, no. 2, pp. 81-114, 2011.
- [16] J. Hom and S.-S. Sheu, “Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells.,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 46, no. 6, pp. 811-20, 2009.
- [17] D. C. Wallace, W. Fan, and V. Procaccio, “Mitochondrial Energetics and Therapeutics,” *Annu Rev Pathol.*, vol. 5, pp. 297-348, 2010.
- [18] B. W. Bigger, A. Y. Liao, A. Sergijenko, and C. Coutelle, “Trial and error: How the unclonable human mitochondrial genome was cloned in yeast,” *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 11, pp. 2863-2870, 2011.
- [19] L. C. Papadopoulou and A. S. Tsiftoglou, “Transduction of human recombinant proteins into mitochondria as a protein therapeutic approach for mitochondrial disorders,” *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 11, pp. 2639-2656, 2011.
- [20] D. L. Nelson and M. M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. W.H. Freeman and Company, 2013.
- [21] A. Wongrakpanich, S. M. Geary, M. A. Joiner, M. E. Anderson, and A. K. Salem, “Mitochondria-targeting particles,” *Nanomedicine*, vol. 9, no. 16, pp. 2531-2543, 2014.
- [22] H. M. McBride, M. Neuspiel, and S. Wasiak, “Mitochondria: More Than Just a Powerhouse,” *Curr. Biol.*, vol. 16, no. 14, pp. 551-560, 2006.
- [23] D. J. Hausenloy and M. Ruiz-Meana, “Not just the powerhouse of the cell: Emerging roles for mitochondria in the heart,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 88, no. 1, pp. 5-6, 2010.
- [24] A. Federico, E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G. N. Gallus, and E. Radi, “Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 322, no. 1-2, pp. 254-262, 2012.
- [25] S. S. Malhi and R. S. R. Murthy, “Delivery to mitochondria: a narrower approach for broader therapeutics,” *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 9, no. 8, pp. 909-935, 2012.
- [26] A. Ferramosca and V. Zara, “Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: Molecular mechanisms of import into mitochondria,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 3, pp. 494-502, 2013.
- [27] P. F. Chinnery and G. Hudson, “Mitochondrial genetics,” *Br. Med. Bull.*, vol. 106, no. 1, pp. 135-159, 2013.
- [28] T. J. Nicholls and M. Minczuk, “In D-loop: 40 years of mitochondrial 7S DNA,” *Exp. Gerontol.*, vol. 56, pp. 175-181, 2014.
- [29] E. McKinney and M. Oliveira, “Replicating animal mitochondrial DNA,” *Genet. Mol. Biol.*, vol. 315, pp. 308-315, 2013.
- [30] J. D. Stumpf and W. C. Copeland, “Mitochondrial DNA replication and disease: Insights from DNA polymerase γ mutations,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 68, no. 2, pp. 219-233, 2011.

- [31] I. N. Shokolenko and M. F. Alexeyev, "Mitochondrial DNA: A disposable genome?," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, no. 9, pp. 1805-1809, 2015.
- [32] I. J. Holt and A. Reyes, "Human mitochondrial DNA replication," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 4, no. 12, pp. 1-16, 2012.
- [33] C. W. Birky, "The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models," *Annu. Rev. Genet.*, vol. 35, pp. 125-148, 2001.
- [34] E. C. Spikings, J. Alderson, and J. C. St. John, "Regulated Mitochondrial DNA Replication During Oocyte Maturation Is Essential for Successful Porcine Embryonic Development," *Biol. Reprod.*, vol. 76, no. 2, pp. 327-335, 2007.
- [35] J. Clark, Y. Dai, and D. K. Simon, "Do somatic mitochondrial DNA mutations contribute to Parkinson's disease?," *Parkinsons. Dis.*, vol. 2011, pp. 1-9, 2011.
- [36] N. Ibrahim *et al.*, "DNA delivery to mitochondria: Sequence specificity and energy enhancement," *Pharm. Res.*, vol. 28, no. 11, pp. 2871-2882, 2011.
- [37] J. A. Zeh and D. W. Zeh, "Maternal inheritance, sexual conflict and the maladapted male," *Trends Genet.*, vol. 21, no. 5, pp. 281-286, 2005.
- [38] M. Sato and K. Sato, "Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 8, pp. 1979-1984, 2013.
- [39] P. F. Chinnery *et al.*, "The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: Random drift, selection or both?," *Trends Genet.*, vol. 16, no. 11, pp. 500-505, 2000.
- [40] J. P. Jenuth, A. C. Peterson, K. Fu, and E. A. Shoubridge, "Random genetic drift in the female germline explains the rapid segregation of mammalian mitochondrial DNA," *Nat. Genet.*, vol. 14, no. 2, pp. 146-151, 1996.
- [41] P. Wonnapijit, P. F. Chinnery, and D. C. Samuels, "The Distribution of Mitochondrial DNA Heteroplasmy Due to Random Genetic Drift," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 83, no. 5, pp. 582-593, 2008.
- [42] G. S. Gorman *et al.*, "Mitochondrial diseases," *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, pp. 1-23, 2016.
- [43] R. Rossignol, B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J.-P. Mazat, and T. Letellier, "Mitochondrial threshold effects," *Biochem. J.*, vol. 370, no. 3, pp. 751-762, 2003.
- [44] J. Nunnari and A. Suomalainen, "Mitochondria: In sickness and in health," *Cell*, vol. 148, no. 6, pp. 1145-1159, 2012.
- [45] E. Ylikallio and A. Suomalainen, "Mechanisms of mitochondrial diseases," *Ann. Med.*, vol. 44, no. 1, pp. 41-59, 2012.
- [46] D. C. Wallace and D. Chalkia, "Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease," *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, vol. 3, no. 10, pp. 1-47, 2013.
- [47] T. Chen, J. He, Y. Huang, and W. Zhao, "The generation of mitochondrial DNA large-scale deletions in human cells," *J. Hum. Genet.*, vol. 56, no. 10, pp. 689-694, 2011.
- [48] J. Szczepanowska, D. Malinska, M. R. Wieckowski, and J. Duszynski, "Biochimica et

- Biophysica Acta S3 Mitochondrial Ion Pumps,” *BBA - Bioenerg.*, vol. 1817, p. S31, 2012.
- [49] R. W. Taylor, “Gene therapy for the treatment of mitochondrial DNA disorders,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 5, no. 2, pp. 183-194, 2005.
- [50] J. M. Collombet and C. Coutelle, “Towards gene therapy of mitochondrial disorders,” *Mol. Med. Today*, vol. 4, no. 1, pp. 31-38, 1998.
- [51] J. Schmiedel, S. Jackson, J. Schaffer, H. Reichmann, and A. H. Schapira, “Mitochondrial cytopathies,” *Curr. Opin. Neurobiol.*, vol. 3, no. 5, pp. 760-7, 1993.
- [52] S. Koene *et al.*, “Developing outcome measures for pediatric mitochondrial disorders: Which complaints and limitations are most burdensome to patients and their parents?,” *Mitochondrion*, vol. 13, no. 1, pp. 15-24, 2013.
- [53] F. Emma, E. Bertini, L. Salviati, and G. Montini, “Renal involvement in mitochondrial cytopathies,” *Pediatr. Nephrol.*, vol. 27, no. 4, pp. 539-550, 2012.
- [54] B. H. Cohen and D. R. Gold, “Mitochondrial cytopathy in adults: What we know so far,” *Cleve. Clin. J. Med.*, vol. 68, no. 7, pp. 625-642, 2001.
- [55] W. Zheng, K. Khrapko, H. A. Collier, W. G. Thilly, and W. C. Copeland, “Origins of human mitochondrial point mutations as DNA polymerase γ -mediated errors,” *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 599, no. 1-2, pp. 11-20, 2006.
- [56] I. J. Holt, A. E. Harding, and J. A. Morgan-Hughes, “Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies,” *Nature*, vol. 331, no. 6158, pp. 717-719, 1988.
- [57] M. V. Zaragoza, J. Fass, M. Diegoli, D. Lin, and E. Arbustini, “Mitochondrial DNA variant discovery and evaluation in human cardiomyopathies through next generation sequencing,” *PLoS One*, vol. 5, no. 8, pp. 1-9, 2010.
- [58] L. Palmieri *et al.*, “Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 14, no. 20, pp. 3079-3088, 2005.
- [59] J. M. Elo *et al.*, “Mitochondrial phenylalanyl-trna synthetase mutations underlie fatal infantile alpers encephalopathy,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 21, no. 20, pp. 4521-4529, 2012.
- [60] G. Silvestri *et al.*, “A new mtDNA mutation associated with a progressive encephalopathy and cytochrome c oxidase deficiency,” *Neurology*, vol. 54, no. 8, pp. 1693-1696, 2000.
- [61] M. Tanaka *et al.*, “Mitochondrial DNA Mutations in Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-Like Episodes (MELAS),” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 174, no. 2, pp. 861-868, 1991.
- [62] S. C. Mak, C. S. Chi, C. Y. Liu, C. Y. Pang, and Y. H. Wei, “Leigh syndrome associated with mitochondrial DNA 8993 T \rightarrow G mutation and ragged-red fibers,” *Pediatr Neurol*, vol. 15, no. 1, pp. 72-75, 1996.
- [63] E. L. Blakely *et al.*, “A New Mitochondrial Transfer RNAPro Gene Mutation Associated With Myoclonic Epilepsy With Ragged-Red Fibers and Other Neurological Features,”

- Arch. Neurol.*, vol. 66, no. 3, pp. 399-402, 2009.
- [64] A. Trifunovic *et al.*, "Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase," *Nature*, vol. 429, pp. 417-423, 2004.
- [65] D. Edgar *et al.*, "Random Point Mutations with Major Effects on Protein-Coding Genes Are the Driving Force behind Premature Aging in mtDNA Mutator Mice," *Cell Metab.*, vol. 10, no. 2, pp. 131-138, 2009.
- [66] E. M. Byrne *et al.*, "Family-based mitochondrial association study of traits related to type 2 diabetes and the metabolic syndrome in adolescents," *Diabetologia*, vol. 52, no. 11, pp. 2359-2368, 2009.
- [67] A. V. Panov *et al.*, "Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines," *Nat. Neurosci.*, vol. 5, no. 8, pp. 731-736, 2002.
- [68] S. Mizutani *et al.*, "Mutations in the mitochondrial genome confer resistance of cancer cells to anticancer drugs," *Cancer Sci.*, vol. 100, no. 9, pp. 1680-1687, 2009.
- [69] M. T. Lin, D. K. Simon, C. H. Ahn, L. M. Kim, and M. F. Beal, "High aggregate burden of somatic mtDNA point mutations in aging and Alzheimer's disease brain.," *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 2, pp. 133-145, 2002.
- [70] T. M. Horton, B. H. Graham, A. E. Kaufman, M. F. Beal, and D. C. Wallace, "Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients," *Neurology*, vol. 45, no. October, pp. 1879-1883, 1995.
- [71] Y. Chen, W. X. Liao, A. C. Roy, A. Loganath, and S. C. Ng, "Mitochondrial gene mutations in diabetes mellitus," *Diabetes Res. Clin. Pract.*, vol. 48, pp. 29-35, 2000.
- [72] A. Chatterjee, E. Mambo, and D. Sidransky, "Mitochondrial DNA mutations in human cancer," *Oncogene*, vol. 25, no. 34, pp. 4663-4674, 2006.
- [73] R. Castellani *et al.*, "Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease," *J. Neurosci. Res.*, vol. 70, no. 3, pp. 357-360, 2002.
- [74] H. K. Lee, "Mitochondrial pathogenesis from genes and apoptosis to aging and disease. Overview," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1011, pp. 1-6, 2004.
- [75] L. A. Loeb, D. C. Wallace, and G. M. Martin, "The mitochondrial theory of aging and its relationship to reactive oxygen species damage and somatic mtDNA mutations," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 102, no. 52, pp. 18769-18770, 2005.
- [76] A. Kukat and A. Trifunovic, "Somatic mtDNA mutations and aging - Facts and fancies," *Exp. Gerontol.*, vol. 44, no. 1-2, pp. 101-105, 2009.
- [77] R. Gredilla, V. A. Bohr, and T. Stevnsner, "Mitochondrial DNA repair and association with aging - An update," *Exp. Gerontol.*, vol. 45, no. 7-8, pp. 478-488, 2010.
- [78] H. A. L. Tuppen, E. L. Blakely, D. M. Turnbull, and R. W. Taylor, "Mitochondrial DNA mutations and human disease," *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, vol. 1797, no. 2, pp. 113-128, 2010.
- [79] R. McFarland, R. W. Taylor, and D. M. Turnbull, "Mitochondrial Disease-Its Impact, Etiology, and Pathology," *Curr. Top. Dev. Biol.*, vol. 77, no. 6, pp. 113-155, 2007.
- [80] B. Szczesny, A. W. Tann, and S. Mitra, "Age- and tissue-specific changes in

- mitochondrial and nuclear DNA base excision repair activity in mice: Susceptibility of skeletal muscles to oxidative injury,” *Mech. Ageing Dev.*, vol. 131, no. 5, pp. 330-337, 2010.
- [81] R. Gredilla and T. Stevnsner, “Mitochondrial base excision repair assays,” *Methods Mol. Biol.*, vol. 920, no. 4, pp. 289-304, 2012.
- [82] I. E. Scheffler, “Mitochondria make a come back,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 49, no. 1-2, pp. 3-26, 2001.
- [83] B. Halliwell, “Oxidative stress and neurodegeneration: Where are we now?,” *J. Neurochem.*, vol. 97, no. 6, pp. 1634-1658, 2006.
- [84] B. M. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, “Mitochondrial proton and electron leaks,” *Essays Biochem.*, vol. 47, no. 4, pp. 53-67, 2010.
- [85] J. F. Turrens, “Mitochondrial formation of reactive oxygen species,” *J. Physiol.*, vol. 552, no. 2, pp. 335-344, 2003.
- [86] W. B. M. de Paula, C. H. Lucas, A.-N. A. Agip, G. Vizcay-Barrena, and J. F. Allen, “Energy, ageing, fidelity and sex: oocyte mitochondrial DNA as a protected genetic template,” *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 368, pp. 1-11, 2013.
- [87] D. De Stefani, M. Patron, and R. Rizzuto, “Structure and function of the mitochondrial calcium uniporter complex,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 9, pp. 2006-2011, 2014.
- [88] P. S. Brookes, “Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle,” *AJP Cell Physiol.*, vol. 287, no. 4, pp. 817-833, 2004.
- [89] M. R. Duchen, A. Verkhatsky, and S. Muallem, “Mitochondria and calcium in health and disease,” *Cell Calcium*, vol. 44, no. 1, pp. 1-5, 2008.
- [90] S. Orrenius, V. Gogvadze, and B. Zhivotovsky, “Calcium and mitochondria in the regulation of cell death,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 460, no. 1, pp. 72-81, 2015.
- [91] S. Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495-516, 2007.
- [92] A. H. Wyllie, “‘Where, O Death, Is Thy Sting?’ A Brief Review of Apoptosis Biology,” *Mol. Neurobiol.*, vol. 42, no. 1, pp. 4-9, 2010.
- [93] A. R. C. J. F. R. Kerr, A. H. Wyllie, “Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide- Ranging Implications in Tissue Kinetics,” *J. Intern. Med.*, vol. 258, no. 6, pp. 479-517, 1972.
- [94] M. Sifringer *et al.*, “Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis,” *Cell Death Dis.*, vol. 3, no. 1, pp. 1-8, 2012.
- [95] B. Favaloro, N. Allocati, V. Graziano, C. Di Ilio, and V. De Laurenzi, “Role of apoptosis in disease,” *Aging (Albany. NY).*, vol. 4, no. 5, pp. 330-349, 2012.
- [96] E. A. Jonas, G. A. Porter, G. Beutner, N. Mnatsakanyan, and K. N. Alavian, “Cell death disguised: The mitochondrial permeability transition pore as the c-subunit of the F1FOATP synthase,” *Pharmacol. Res.*, vol. 99, pp. 382-392, 2015.

- [97] G. Kroemer, L. Galluzzi, and C. Brenner, "Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death," *Physiol. Review*, vol. 87, pp. 99-163, 2007.
- [98] P. Mancheño-Corvo and P. Martín-Duque, "Viral gene therapy," *Clin. Transl. Oncol.*, vol. 8, no. 12, pp. 858-867, 2006.
- [99] D. Zhao, C. Q. Wang, R. X. Zhuo, and S. X. Cheng, "Modification of nanostructured calcium carbonate for efficient gene delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 118, pp. 111-116, 2014.
- [100] M. A. Kay, J. C. Glorioso, and L. Naldini, "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics," *Nat. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 33-40, 2001.
- [101] L. S. Young, P. F. Searle, D. Onion, and V. Mautner, "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application," *J. Pathol.*, vol. 208, no. 2, pp. 299-318, 2006.
- [102] X. Gao, K.-S. Kim, and D. Liu, "Nonviral gene delivery: What we know and what is next," *AAPS J.*, vol. 9, no. 1, pp. 92-104, 2007.
- [103] H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy, A. J. Vegas, J. R. Dorkin, and D. G. Anderson, "Non-viral vectors for gene-based therapy," *Nat. Rev. Genet.*, vol. 15, no. 8, pp. 541-555, 2014.
- [104] M. Ramamoorth and A. Narvekar, "Non viral vectors in gene therapy - An overview," *J. Clin. Diagnostic Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 1-6, 2015.
- [105] K. M. Abu-Salah, A. A. Ansari, and S. A. Alrokayan, "DNA-based applications in nanobiotechnology," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2010, pp. 1-15, 2010.
- [106] V. Weissig, S. V. Boddapati, L. Jabr, and G. G. D'Souza, "Mitochondria-specific nanotechnology," *Nanomedicine*, vol. 2, pp. 275-285, 2007.
- [107] O. Boussif *et al.*, "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo : Polyethylenimine Mergny , Daniel Scherman , Barbara Demeneix and Jean-Paul Behr Source : Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of A," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, pp. 7297-7301, 1995.
- [108] D. Fischer, T. Bieber, Y. Li, H.-P. Elsässer, and T. Kissel, "A Novel Non-Viral Vector for DNA Delivery Based on Low Molecular Weight, Branched Polyethylenimine: Effect of Molecular Weight on Transfection Efficiency and Cytotoxicity," *Pharm. Res.*, vol. 16, no. 8, pp. 1273-1279, 1999.
- [109] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, J. Krieglstein, and T. Kissel, "In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis," *Biomaterials*, vol. 24, pp. 1121-31, 2003.
- [110] S. Hong *et al.*, "Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability," *Bioconjug. Chem.*, vol. 17, no. 3, pp. 728-734, 2006.
- [111] A. Kwok and S. L. Hart, "Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*,

- vol. 7, no. 2, pp. 210-219, 2011.
- [112] F. N. Al-Deen, J. Ho, C. Selomulya, C. Ma, and R. Coppel, "Superparamagnetic nanoparticles for effective delivery of malaria DNA vaccine," *Langmuir*, vol. 27, no. 7, pp. 3703-3712, 2011.
- [113] V. Kafil and Y. Omid, "Cytotoxic impacts of linear and branched polyethylenimine nanostructures in A431 cells," *BiolImpacts*, vol. 1, no. 1, pp. 23-30, 2011.
- [114] Z. Dai and C. Wu, "How Does DNA Complex with Polyethylenimine with Different Chain Lengths and Topologies in Their Aqueous Solution Mixtures?," *Macromolecules*, vol. 45, pp. 4346-4353, 2012.
- [115] C. Y. Tay, N. Menon, D. T. Leong, and L. P. Tan, "Molecular Architecture Governs Cytotoxicity and Gene Transfection Efficacy of Polyethylenimine Based Nanoplexes in Mammalian Cell Lines," *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, vol. 25, no. 2, pp. 301-311, 2015.
- [116] K. Utsuno, H. Kono, E. Tanaka, N. Jouna, Y. Kojima, and H. Uludağ, "Low Molecular Weight Branched PEI Binding to Linear DNA," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, vol. 64, no. 10, pp. 1484-1491, 2016.
- [117] P. Y. Teo *et al.*, "Hydrophobic modification of low molecular weight polyethylenimine for improved gene transfection," *Biomaterials*, vol. 34, no. 32, pp. 7971-7979, 2013.
- [118] J. Zhao *et al.*, "Synthesis and characterization of low molecular weight polyethyleneimine-terminated Poly(β -amino ester) for highly efficient gene delivery of minicircle DNA," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 463, pp. 93-98, 2016.
- [119] C. Sun, T. Tang, H. Uludağ, and J. E. Cuervo, "Molecular dynamics simulations of DNA/PEI complexes: Effect of PEI branching and protonation state," *Biophys. J.*, vol. 100, no. 11, pp. 2754-2763, 2011.
- [120] A. F. Jorge, M. C. Morán, M. P. Vinardell, J. C. Pereira, R. S. Dias, and A. A. C. C. Pais, "Ternary complexes DNA-polyethylenimine-Fe(iii) with linear and branched polycations: Implications on condensation, size, charge and in vitro biocompatibility," *Soft Matter*, vol. 9, no. 45, pp. 10799-10810, 2013.
- [121] Q. F. Zhang *et al.*, "Amino acid-modified polyethylenimines with enhanced gene delivery efficiency and biocompatibility," *Polymers (Basel)*, vol. 7, no. 11, pp. 2316-2331, 2015.
- [122] D. Costa, A. J. M. Valente, and J. Queiroz, "Stimuli-responsive polyamine-DNA blend nanogels for co-delivery in cancer therapy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 132, pp. 194-201, 2015.
- [123] Q.-Q. Zhao *et al.*, "N/P Ratio Significantly Influences the Transfection Efficiency and Cytotoxicity of a Polyethylenimine/Chitosan/DNA Complex," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 32, no. 4, pp. 706-710, 2009.
- [124] W. Wang *et al.*, "Polyethylenimine-mediated gene delivery into human bone marrow mesenchymal stem cells from patients," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 15, no. 9, pp. 1989-1998, 2011.

- [125] A. V. Ulasov, Y. V. Khramtsov, G. A. Trusov, A. A. Rosenkranz, E. D. Sverdlov, and A. S. Sobolev, "Properties of PEI-based polyplex nanoparticles that correlate with their transfection efficacy," *Mol. Ther.*, vol. 19, no. 1, pp. 103-112, 2011.
- [126] D. Costa, W. H. Briscoe, and J. Queiroz, "Polyethylenimine coated plasmid DNA-surfactant complexes as potential gene delivery systems," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 133, pp. 156-163, 2015.
- [127] D. Costa, A. J. M. Valente, J. A. Queiroz, and Â. Sousa, "Finding the ideal polyethylenimine-plasmid DNA system for co-delivery of payloads in cancer therapy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 170, pp. 627-636, 2018.
- [128] S. Biswas, N. S. Dodwadkar, A. Piroyan, and V. P. Torchilin, "Surface conjugation of triphenylphosphonium to target poly(amidoamine) dendrimers to mitochondria," *Biomaterials*, vol. 33, no. 18, pp. 4773-4782, 2012.
- [129] J. Zielonka *et al.*, "Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications," *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 15, pp. 10043-10120, 2017.
- [130] E. R. Bielski, Q. Zhong, M. Brown, and S. R. P. Da Rocha, "Effect of the Conjugation Density of Triphenylphosphonium Cation on the Mitochondrial Targeting of Poly(amidoamine) Dendrimers," *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 8, pp. 3043-3053, 2015.
- [131] J. Santos, F. Sousa, J. Queiroz, and D. Costa, "Rhodamine based plasmid DNA nanoparticles for mitochondrial gene therapy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 121, pp. 129-140, 2014.
- [132] D. Costa, C. Costa, M. Caldeira, L. Cortes, J. A. Queiroz, and C. Cruz, "Targeting of Cellular Organelles by Fluorescent Plasmid DNA Nanoparticles," *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 9, pp. 2928-2936, 2017.
- [133] S. Salatin, S. Maleki, and A. Y. Khosroushahi, "Effect of the surface modification , size , and shape on cellular uptake of nanoparticles," *Cell Biol. Int.*, pp. 1-23, 2015.
- [134] X. Liu *et al.*, "Size Dependent Cellular Uptake of Rod-like Bionanoparticles with Different Aspect Ratios," *Sci. Rep.*, vol. 6, pp. 1-10, 2016.
- [135] S. Di Gioia and M. Conese, "Polyethylenimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 2, pp. 163-188, 2008.

